DIE GEGENWÄRTIGE BEDEUTUNG DER IMMUNFLUORESZENZ FÜR DIE KINDERHEILKUNDE

- Eine Übersicht -

Gerhard Kühnen

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 26 81 77

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. H. Spiess

Die gegenwärtige Bedeutung der Immunfluoreszenz für die Kinderheilkunde
- Eine Übersicht -

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gerhard Kühnen

aus

Kevelaer

München 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. J. Suschke
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6.12.1979

Inhaltsübersicht

I. Einleitung und Aufgabenstellung
II. Hauptteil
1. Das Prinzip der Immunfluoreszenz
1.1. Fluorochrome
1.2. Fluoreszenz
2. Die gebräuchlichsten Methoden
2.1. Die direkte Technik
2.2. Die indirekte Technik
2.3. Die Anti-Komplement-Technik
2.4. Die Anwendung markierter Antigene
2.5. Spezielle Testverfahren
2.5.1. Der Sandwich-Test (= Doppelschichtverfahren)
2.5.2. Die Membranfluoreszenz
3. Kontrolle und Standardisierung der Testverfahren
3.1. Gegenfärbungen
3.2. Die unspezifische Fluoreszenz
3.2.1. Eigenfluoreszenz
3.2.2. Fluorochromierung
3.2.3. Die Konzentration von Patientenserum
3.2.4. Die Vereinigung der Konjugate
3.2.5. Die Änderung der Konjugateigenschaften
3.2.5.1. Abnahme der Hydrophilie
3.2.5.2. Zunahme der Basophilie
3.2.5.3. Abnahme oder Verlust der Antigenbindungsfähigkeit
3.3. Die Problematik der Standardisierung
3.3.1. Dokumentation
3.3.2. Automatisierung
3.4.1. Das Immunologische System
3.5.1. Die Versuchstechnik
4. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Mikrobiologie
4.1. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Bakteriologie
4.1.1. Bordetella pertussis
4.1.2. Enteropathogene Coli-Bakterien-Dyspepsie-Coli-Diagnostik

4.1.3. Salmonellen
4.1.4. Staphylokokken
4.1.5. Streptokokken
4.1.6. Mykoplasma pneumoniae
4.1.7. Hämophilus influenzae
4.1.8. Bakterielle Meningitis: Neisseria meningitidis, Diplococcus pneumoniae und Hämophilus influenzae
4.1.9. Die indirekte Immunfluoreszenz in der Serodiagnostik der chronischen Pyelonephritis
4.2. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Virologie
4.2.1. Varizella - Zoster - Virus (VZW)
4.2.2. Zytomegalie - Virus
4.2.3. Masern - Virus
4.2.4. Respiratory - Syncytial - (RS) Viren, Influenza - Parainfluenza
4.3. Die Anwendung Der Immunfluoreszenz in der Parasitologie - Protozoen
4.3.1. Toxoplasma gondii
4.3.2. Pneumocystis carinii
4.3.3. Treponema pallidum
4.4. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Mykologie
5. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Immunpathologie
5.1. Nachweis von Autoantikörpern
5.1.1. Antinukleäre Faktoren
5.2. Nachweis von Immunkomplexniederschlägen
5.2.1. Poststreptokokkennephritis
5.2.2. IgA/IgG - Nephropathie, "Berger" - Glomerulonephritis
5.2.3. Stickler - Syndrom
5.2.4. Glomerulonephritis bei persistierendem Hepatitis B - Antigen
5.2.5. Membranöse Glomerulonephritis
5.2.6. Herdförmige glomeruläre Sklerosen
5.2.7. Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)
5.2.8. Renopulmonales Syndrom, Goodpasture - Syndrom
5.2.9. Interstitielle Nephritis
5.2.10. Lupusnephritis

5.2.11. Penicillamin - Nephropathie
5.2.12. Transplantatnephritis
5.2.13. Kritische Schlußbetrachtung über Anwendung der Immunfluoreszenz in der Immunpathologie
5.3.1. Chronische Polyarthritis, rheumatische Arthritis
5.3.2. Lupus erythematodes
5.3.3. Hämolytisch-urämisches Syndrom - Neuraminidase - induzierte Hämolyse
5.3.4. Chronisch entzündliche Lebererkrankungen
5.3.5. Alpha - 1 - Antitrypsinmangel
5.3.6. Immundiagnostik der Leukämien
5.3.7. Kollagenkrankheiten
5.3.8. Galaktosämie
6. Wirtschaftlichkeit der Immunfluoreszenzmethoden
III. Zusammenfassung
IV. Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547005_0014

I. Einleitung und Aufgabenstellung

Die von Coons, A. H. und Mitarb. im Jahre 1941 entwickelte Immunfluoreszenzfärbung hat heute weiteste Anwendung gefunden in Klinik und Forschung. Sie ist seit den Fünfziger Jahren zu einem wichtigen Teil der klinischen Routinediagnostik geworden. Diese Immunfluoreszenzmethode vereinigt die Spezifiät der serologischen Reaktionen mit der hohen Nachweisempfindlichkeit von fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, Fellinger, K. und Mitarb. (1968). Es ist für die moderne Labordiagnostik von wesentlichem Vorteil, daß diese Methode mit geringerem Material- und Zeitaufwand als die meisten der konventionellen Nachweismethoden schnelle und beweiskräftige Ergebnisse liefert. Das Anwendungsspektrum der Immunfluoreszenz umfaßt die Gebiete der Bakteriologie, der Virologie, der Mykologie und Parasitologie, sowie der Immunpathologie und auch der Botanik, Nairn, R.C. (1976); Goldmann, M. (1968).

Aufgabenstellung

Aus der Fülle der Anwendungsmöglichkeiten der Immunfluoreszenz soll die vorliegende Arbeit die für die heutige klinische Pädiatrie im weiten Sinne relevanten Nachweisverfahren näher beschreiben, ihre Vorteile gegenüber anderen serologischen Verfahren vergleichen und ihre Wirtschaftlichkeit untersuchen. Die Anwendungsbeispiele der Coonschen Fluoreszenz-Technik zeigen ihren diagnostischen Wert im Bereich der Mikrobiologie, beim Nachweis von antinukleären Faktoren und Antikörpern, bei wahrscheinlichen und diskutierten Autoimmunkrankheiten, außerdem bei der Darstellung und Charakterisierung bestimmter gewebs- und zellgebundener Antigene.

II. Hauptteil

1. Das Prinzip der Immunfluoreszenz

Fluoreszierende Farbstoffe werden in einer festen chemischen Bindung an Antikörper gekoppelt, wobei ihre spezifischen immunologischen Eigenschaften im wesentlichen erhalten bleiben. Jene Farbstoffe werden als Fluorochrome bezeichnet, die damit markierten Antikörperpräparate als Konjugate. Dabei ist es wesentlich, daß das Konjugat mit dem korrespondierenden Antigen fast ebenso gut reagiert wie das Antiserum vor der Konjugation. Wird ein antigenhaltiges Präparat, z.B. ein Bakterienausstrich oder der Gefrierschnitt eines Organs mit dem Konjugat überschichtet, so kommt es zur Bindung der fluoreszierenden Antikörpermoleküle an das Antigen. Durch Waschen wird überschüssiges Konjugat entfernt, und unter Benutzung einer geeigneten Lichtquelle treten jene Stellen des Präparats leuchtend in Erscheinung, an denen Antikörpermoleküle gebunden wurden. Diese Fluoreszenz hebt sich deutlich gegen den kein entsprechendes Antigen enthaltenden und daher dunklen Hintergrund ab.

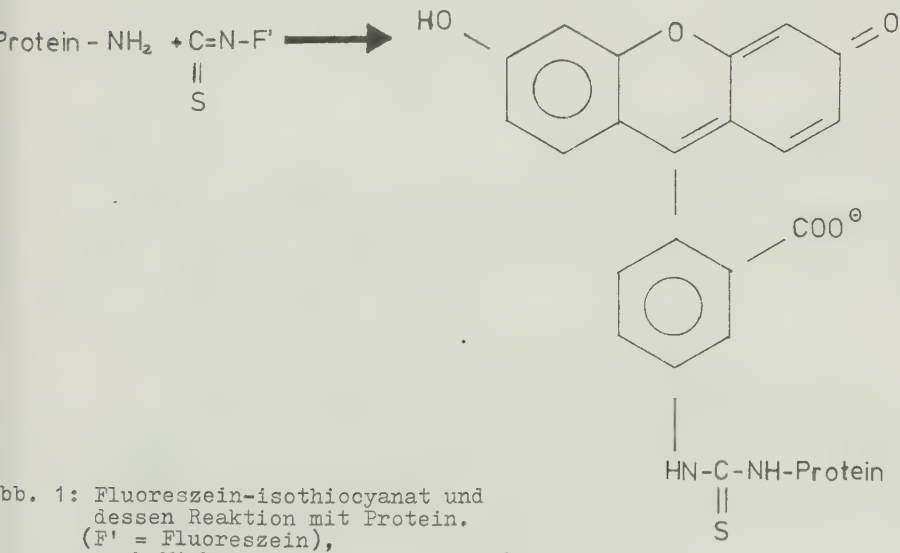
Die Immunfluoreszenzmethode vereinigt in sich die immunologische Spezifität, die Empfindlichkeit der Histochemie und die Präzision der Mikroskopie, Wick, G. und Mitarb. (1976). Sie erlaubt die gleichzeitige kombinierte Prüfung zweier wesentlicher Kriterien des zu untersuchenden Materials, Wick, G. und Mitarb. (1976):

1. Nachweis eines Antigen-Antikörper-Geschehens und die Prüfung der serologisch-immunologischen Spezifität.
2. Nachweis der Lokalisation und der morphologischen Charakteristika der Antigen-Antikörper-Reaktion.

1.1. Fluorochrome

Die chemischen Voraussetzungen zur Kupplung der fluoreszierenden Moleküle an Proteine erarbeiteten Creech, H. J. und Jones, R.N. (1940) am Beispiel des beta-Anthrazenisozyanats. Stabile Bindungen an das Protein ohne Änderung dessen immunologischer Eigenschaften und bei Erhaltung der Fluoreszenz sind durch Bindung von Azo-, Karbamid-, Thiokarbamid- und Sulfonamidgruppen möglich, Barthelmes, H. und Sönnichsen, N. (1970). Von den entwickelten und verbesserten Fluoreszenzfarbstoffen hat sich das von Riggs, J.L. und

Mitarb. (1958) eingeführte Fluoreszeinisothiozyanat (FITC = Emission bei 512 nm, im Grünbereich) allgemein durchgesetzt. Die Derivate des Fluoreszein sind auch heute noch die am meisten verwendeten Fluorochrome; während das vergleichbar stärker rotfluoreszierende Rhodamin - B - Isothiozyanat (Emission bei 595 nm, Riggs, J. L. und Mitarb. 1958) wegen einer geringeren Intensität, schlechteren Wahrnehmbarkeit, der Notwendigkeit der Kupplung mit Azetonzusatz und der Überschneidung mit der rötlichen Eigenfluoreszenz des Gewebes schon wesentlich seltener Verwendung finden, Barthelmes, H. und Sönnichsen, N. (1970). Andere Rhodaminderivate sind: Tetramethylrhodaminisothiozyanat (TRITC), Lissamin Rhodamin B 200 und Sulfonylchlorid (RB 200 SC). TRITC wird über die Thiocarbamid - Bindung an Proteine gekoppelt; RB 200 SC über eine Sulfonylamid - Bindung, Wick, G. und Mitarb. (1976). Rhodaminkonjugate werden oft zusammen mit Fluoreszenzkonjugaten im Rahmen der sog. Doppelfärbemethode zur gleichzeitigen Darstellung von zwei verschiedenen Antigenen in einem Präparat verwendet. Dabei heben sich sowohl die grüne als auch die rote Fluoreszenz deutlich von der Eigenfluoreszenz der Gewebe ab. (Bildbeispiele bei Wick, G. und Mitarb. (1976)).



bb. 1: Fluoreszein-isothiocyanat und dessen Reaktion mit Protein. (F' = Fluoreszein), nach Wick, G. und Mitarb. 1976

1.2. Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz versteht man die Fotolumineszenzemission ohne erforderliche Aktivierungswärme und mit einem Nachklingen der Leuchterscheinungen unter 10^{-8} sec , Barthelmes, H. und Sönnichsen, N. (1970). Es ist daher verständlich, daß alle jene experimentellen Variablen, die die Ladungsverteilung der Elektronenhülle beeinflussen: beispielsweise Konzentration, pH-Wert oder Temperatur, von großem Einfluß auf die Fluoreszenzerscheinung sind, Wick, G. und Mitarb. (1976). Stabile organische Verbindungen mit konjugierter Doppelbindung (-C=C-C=C-, vorwiegend aromatische Kohlenwasserstoffe, s. Abbildung1) absorbieren Lichtquanten, wodurch ein sog. „angeregter Zustand" entsteht (d.h. energiereicher Zustand der Elektronen). Ein Teil der Energie kann durch Rückkehr der Elektronen in den alten Zustand als Fluoreszenz, d.h. Lichtemission niedriger Frequenz bzw. größerer Wellenlänge abgegeben werden, (Gesetz von Stokes) Barthelmes, H. und Sönnichsen, N. (1970). Die UV-Erregerstrahlung im Fluoreszenzmikroskop führt zu einer Fluoreszenzstrahlung im Bereich des sichtbaren Lichtes.

Als Autofluoreszenz oder Primärfluoreszenz wird die Fluoreszenz natürlich vorkommender Stoffe bzw. Gewebe in der Histologie bezeichnet. Sind zur Erzielung von Fluoreszenzerscheinungen Färbung oder chemische Präparation erforderlich, so spricht man von Sekundärfluoreszenz, wozu auch die Immunfluoreszenz zu subsummieren ist, Wick, G. und Mitarb. (1976).

2. Die gebräuchlichsten Methoden

In der Routinediagnostik werden die einzelnen Reagenzien (Kits) des Immunfluoreszenztestes tropfenweise nacheinander auf das Antigenpräparat aufgetragen. Zahlreiche und komplexe Immunreaktionen können auf diese Weise ausgeführt werden. Grundsätzlich gibt es drei Möglichkeiten, den Test auszuführen.

2.1. Die direkte Technik (nach Wick, G. und Mitarb. (1976), Asamer, H. (1968)

Im direkten Test wird das Konjugat (=fluorochromierte Immunglobuline) mit definierter Antikörperspezifität ohne jede Zwischenstufe auf das Antigenpräparat aufgetropft. Das zu untersuchende Antigen wird durch Bindung des markierten Antikörpers direkt

nachgewiesen. Bei den sog. Autoimmunkrankheiten jedoch werden bereits in vivo Antikörper (Auto-Antikörper) gebildet und im Gewebe gebunden. Diese Auto-Antikörper können nun selbst Antigene für Anti-Immunglobulin-Konjugate darstellen und auf diese Weise in vivo im Gewebe direkt nachgewiesen werden. Derselbe direkte in vivo-Nachweis gelingt mit Anti-Komplement-Konjugat. Hier fungiert im Gewebe gebundenes Komplement als Antigen. Umgekehrt kann mit definierten Antigenpräparationen direkt die Spezifität von Konjugaten ermittelt und überprüft werden. Ferner ist es möglich, die spezifische Ablagerung eines Konjugates in bestimmten Organen des lebenden Organismus nachzuweisen. Dafür wird einem Versuchstier das zur Frage stehende Konjugat injiziert und das entsprechende Organ anschließend immunhistologisch untersucht.
Die Anwendung des direkten Testes zusammengefaßt: Nachweis von gewebsgebundenen Antikörpern und Immunkomplexen im Biopsiematerial, sowie Darstellung von gewebs- und zellgebundenen Antigenen.

2.2. Die indirekte Technik (nach Wick, G. und Mitarb. (1976))
Das zu untersuchende Patientenserum wird unmarkiert mit jenen Antigenen, gegen die eine Antikörperproduktion vermutet wird, in Reaktion gebracht. Sind Antikörper vorhanden, so werden sie sich an die homologen Antigendeterminanten binden. Diese antigengebundenen Antikörper dienen nun ihrerseits als Antigene für ein fluorochromiertes Antiglobulin-Serum. In einem zweiten Schritt, - und damit indirekt - wird das zu untersuchende Antigen dadurch identifiziert, daß man jene spezifischen, unmarkierten und antigengebundenen Antikörper mit einem fluorochromierten Antiserum gegen die Immunglobulineigenschaft jener Antikörper überschichtet. Es handelt sich also um eine Anti-Immunglobulintechnik, bei der drei Reaktionspartner beteiligt sind:

1. das Antigen
2. der zu beurteilende Patienten-Antikörper
3. ein fluorochromierter Antikörper gegen den in Frage stehenden Patienten-Antikörper

Die Anwendung des indirekten Testes zusammengefaßt: Suchtest für Antikörper; Darstellung von Antikörpern, bei denen eine Fluorochromierung nicht durchgeführt werden kann (z.B. weil zu wenig Serum) oder vermieden werden soll.

Die indirekte Technik bietet mehrere Vorteile:

1. Die Fluoreszenz ist leuchtender als beim direkten Test, da immer mehrere der fluoreszierenden Immunglobuline mit einem Antigen - Molekül reagieren (siehe Abbildung 2), Fellinger, K. und Mitarb. (1968). Die indirekte Technik erlaubt es daher, Antikörper in schwächerer Konzentration nachzuweisen.

2. Es ist möglich, daß verschiedene Patientenseren mit einem einzigen markierten Serum, dem Antiglobulinserum (Anti-Gamma-Globulinserum) untersucht werden. Das spart viel Zeit und zusätzlichen Aufwand, da nicht jedes Patientenserum - wie es beim direkten Test nötig wäre, - gesondert mit Fluoreszeinfarbstoff konjugiert werden muß.

3. Die besondere Flexibilität dieser Methode erweist sich darin, daß beispielsweise Antikörper innerhalb der verschiedenen Klassen und Subklassen teilweise quantitativ, bzw. semiquantitativ untersucht werden können.
Es müssen dabei Konjugate von Antiseren verwendet werden, die mit individuellen Immunglobulinketten reagieren.

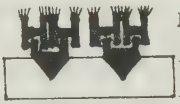
4. Die indirekte Immunfluoreszenztechnik hat höhere Sensibilität als die Präzipitations- und Komplementbindungsreaktion, sie ist jedoch weniger empfindlich als die passive Hämagglutination und autoradiographische Methode.

2.3. Die Anti-Komplement-Technik (nach Wick, G. und Mitarb. (1976))
Einem Antigen-Antikörperkomplex wird Komplement zugesetzt, in vivo und in vitro bilden diese Reaktionspartner Komplexe, die durch hinzugegebenes Anti-Komplement-Konjugat nachgewiesen werden. Auch die Anti-Komplement-Technik ist empfindlicher als der direkte Test, meist übertrifft sie in dieser Hinsicht auch den indirekten Test.

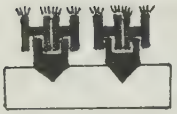
2.4. Die Anwendung markierter Antigene (nach Wick, G. und Mitarb. (1976))
Auch die Antigene können wie Antikörper mit Fluorochrome markiert werden, dadurch können sessile, gewebsfixierte Antikörper zur Darstellung gebracht werden.

A Markierte Antikörper
a) Direkter Test

Sonderfälle



b) Indirekter Test
1. Anti-Immunglobulin Technik



2. Anti-Komplement-Technik

B Markiertes Antigen

Abb.2 : Hauptmodifikationen der Immunfluoreszenzmethode, nach Wick, G. und Mitarbeiter, 1976

Bei der Anti-Immunglobulin-Technik reagieren immer mehrere Antikörpermoleküle mit einem Antigenmolekül; dies entspricht einem Verstärkereffekt der Antiglobulinmethode im Vergleich zum indirekten Test: in Abbildung 2 durch ein Antikörper/ Antigen-Verhältnis von 2 schematisch angedeutet.

2.5. Spezielle Testverfahren (nach Barthelmes, H. und Sönnichsen, N. (1970)

2.5.1. Der Sandwich-Test (Doppelschichtverfahren)
Das Antigen liegt wie ein Sandwich zwischen zwei Antikörpern. Man belädt, um Antikörper im Gewebsschnitt zu identifizieren, diese mit homologem Antigen und markiert die Reaktion mit spezifischem Immunserum, so daß eine Antikörper-Antigen-Antikörper-Schichtung zustande kommt.

2.5.2. Die Membranfluoreszenz
Darstellung von antigenen Determinanten an Zelloberflächen mit Hilfe der indirekten oder direkten Technik.

3. Kontrolle und Standardisierung der Testverfahren (nach Wick, G. und Mitarb. (1976)
Um Fehlurteilen vorzubeugen, sind wie bei allen serologischen Testen geeignete Kontrollen auch bei den Immunfluoreszenzversuchen erforderlich. Es soll nur auf einzelne Kontrollmaßnahmen und auf einige Phänomene hingewiesen werden, die zu falschen Testergebnissen führen.

3.1. Gegenfärbungen
Um den Prozentsatz fluoreszierender Zellen innerhalb einer Zellsuspension zu beurteilen, ist es oftmals notwendig, den normalerweise ungefärbten und dunklen oder unspezifisch fluoreszierenden Hintergrund anzufärben. Zwei Färbemethoden sind gebräuchlich:

1. Evansblau - Methode (Nichols, R. L. und Mc. Comb, D. E. (1962))
2. Eriochrom - Schwarz - Methode (Fey, H.(1972))

3.2. Die unspezifische Fluoreszenz (nach Wick, G. und Mitarb. (1976)
Die unspezifische Färbung beruht nicht auf der zu untersuchenden Antigen-Antikörper-Reaktion, sie kann vielmehr in folgenden Phänomenen ihre Ursache haben.

3.2.1. Eigenfluoreszenz
Viele Gewebe- und Präparatverunreinigungen zeigen ohne vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff behandelt zu sein bei Bestrahlung mit UV-Licht sog. Autofluoreszenz. Bei jedem Immunfluoreszenzversuch ist daher ein mit Kochsalz behandeltes Kontrollpräparat auf Eigenfluoreszenz zu prüfen.

3.2.2. Fluorochromierung
Von Bedeutung ist die Menge des Farbstoffes im Verhältnis zur Gamma-Globulinfraktion des zu markierenden Antiserums, ausgedrückt im gewichtsbezogenen molaren F/P-Quotient, als Maß für die optische Empfindlichkeit. Die günstigsten Verhältnisse betragen nach Wick, G. und Mitarb. (1976): 2,5 bis 4,5. Bei stärkerer Beladung von Antikörpermolekülen mit Farbstoff treten chemische Bindungsformen ein, die zur Dissoziation von Fluorochrom führen. Diese Dissoziationsprodukte und das von Anfang an immer in freier Form, d. h. nicht gebundene Fluorochrom, verhält sich wie ein gewöhnlicher histologischer Farbstoff und ist somit in der Lage, unspezifische Fluoreszenz oder genauer eine Fluorochromierung hervorzurufen. Die Verwendung hochgereinigter Konjugate und besonders eines mit gepufferter Kochsalzlösung behandeltes Kontrollpräparat sollen diesen Fehler verhindern bzw. aufdecken.

3.2.3. Die Konzentration von Patientenserum
Wird im Immunfluoreszenztest mit zu hoher Konzentration des Patientenserums gearbeitet, so lagern sich neben den spezifischen Antikörpern auch andere, unspezifische Proteinfraktionen des Serums an das Präparat an und binden ebenfalls Konjugat. Auch hier entsteht eine unspezifische Fluoreszenz. Gleichzeitige Testdurchführung mit einer Normalserumkontrolle deckt diesen Fehler auf. Es sollen daher Patientenseren, die nicht mindestens 1:10 verdünnt wurden, im Immunfluoreszenztest keine besondere Wertung erfahren,

nach Wick, G. und Mitarb. (1976).

3.2.4. Die Verunreinigung der Konjugate

Sog. Ballastproteine, die neben den reinen Antikörperfraktionen im Konjugat erhalten sind, binden Fluorochrome und können daher eine unspezifische Fluoreszenz hervorrufen. Die Verwendung verdünnter Konjugate oder die Absorption des Konjugates mit Leberpulver schaltet diese Art der unspezifischen Färbung aus.

3.2.5. Die Änderung der Konjugateigenschaften

Durch die Reaktion der Antikörper mit dem Fluorochrom kommt es unter Umständen zu einer wesentlichen Veränderung der Eiweißstruktur der antikörperhaltigen Gamma-Globulinfraktion. Diese Änderungen können Ursache für unspezifische Fluoreszenz sein.

3.2.5.1. Abnahme der Hydrophilie

Die Hydrophilie-Abnahme von Protein ist bedingt durch den aromatischen Charakter des konvalent gebundenen Fluorochroms. Eine unspezifische Fluoreszenz ist um so eher zu erwarten, je mehr Molekül Fluorochrom an Protein gebunden sind. Daher müssen z. B. bei längerer Aufbewahrung des Konjugates wasserunlösliche Partikel durch Zentrifugieren vor der Verwendung entfernt werden.

3.2.5.2. Zunahme der Basophilie

Das Freiwerden von Carboxylgruppen im Fluorochrom bewirkt eine Veränderung des isoelektrischen Punktes in Richtung auf niedrigere Werte und damit eine Zunahme der Basophilie. Es entsteht eine elektrostatische Wechselwirkung von stark basophilen Konjugatbestandteilen zu basischen Proteinen im Zytoplasma, die die Ursache einer unspezifischen Fluoreszenz ist. Zum Beispiel durch oxidative Desaminierung mit salpetriger Säure können der basische Charakter und damit die elektrostatische Bindungsneigung beseitigt werden.

3.2.5.3. Abnahme oder Verlust der Antigenbindungsfähigkeit
Die spezifische Antigenbindungsfähigkeit kann dadurch verlorengehen, daß die reaktive Gruppe des Antikörper-Proteins, an die sich der Farbstoff bindet, gerade im Zentrum der Antigenbindestelle liegt. FITC beispielsweise reagiert meist mit der freien Aminogruppe des Lysins.
Benachbarte Aminogruppen können nach der Reaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff die Antigenbindungskraft oder die Spezifität der Antigenbindungsstelle abschwächen (=Avidität) oder verändern.

3.3. Die Problematik der Standardisierung (nach Wick, G. und Mitarb. (1976))
Die relativ komplexe Technik der Immunfluoreszenzmethode und die Tatsache, daß die Testergebnisse auf subjektivem Ablesen und Beurteilen beruhen, lassen eine große Diskrepanz der Resultate von Labor zu Labor, ja selbst in ein und demselben Labor aufkommen. Oftmals sind die Testergebnisse nicht reproduzierbar. Ringversuche, die in den letzten Jahren wiederholt durchgeführt wurden, zeigten bei der Anwendung der gebräuchlichen Immunfluoreszenzmethoden große Unterschiede bezüglich Antikörpergehalt und Spezifität.
Aus den bisherigen Ausführungen dieser Arbeit ist zu entnehmen, daß der Immunfluoreszenztest auf drei maßgeblichen Faktoren beruht:

1. die fluoreszenzoptische Einrichtung,
2. das immunologische System,
3. Die Versuchstechnik.

Eine Standardisierung dieser drei grundsätzlichen Faktoren ist notwendig, um jene Diskrepanz der Testergebnisse auf ein Minimum zu reduzieren, Wick, G. (1971). Auf nationalem und internationalem Forum ist man um dieses Ziel bemüht. Das Bundesgesundheitsamt publiziert Empfehlungen für die Durchführung bestimmter Immunfluoreszenzuntersuchungen (Bundesgesundheitsblatt, 20 (1976)).
Fünf internationale Immunfluoreszenzkongresse haben bisher stattgefunden; von den letzten drei wurden die weitgehend übereinstimmenden Diskussionsergebnisse publiziert (Standardization in Immunfluorescence, E.: E. J. Holbarow (1970); Proc. of the

Fifth Int. Conference on Immunfluorescence and Related Techniques Ed.: W. Hijmans (1975).
Die moderne Entwicklung der Techniken, die der Standardisierung dienen, seien im folgenden skizziert. (Einzelheiten sind der entsprechenden Fachliteratur zu entnehmen.

3.3.1. Dokumentation
Zur objektiven Dokumentation der Testergebnisse bedarf es der Fotokamera. Es gibt ausführliche Richtlinien für die Durchführung der Mikrofotografie, u. a. Kunz, Ch. und Mitarb. (1961).

3.3.2. Automatisierung
Eine Automatisierung des Immunfluoreszenztestes ist bisher trotz intensiver Forschung noch nicht gelungen, Wick, G. und Mitarb. (1976). Das Problem liegt beim Ablesen von Präparaten darin, daß es nicht möglich ist, spezifische und unspezifische Signale zu unterscheiden. Laserlicht als Erregerlichtquelle könnte die Lösung dieses Problems bringen.
Kaufman, G. und Mitarb. (1971); Vozelj, J. M. und Mitarb. (1972); Bergquist, N. R. (1973); Schauenstein, K. und Mitarb. (1975). Laserlicht liefert hochenergetisches, monochromatisches Licht mit gleichbleibender Intensität. Man würde eine wesentliche stärkere Emission von Fluoreszenzlicht erhalten. Allerdings sind die Forschungen auf diesem Gebiet noch nicht weit fortgeschritten. der „Fluoreszenzaktivierte - Zell - Sortierer" (FACS) stellt die erste diesbezügliche Neuentwicklung dar, der die quantitative Trennung fluoreszierender von nicht fluoreszierenden, lebenden Zellen im Durchflußverfahren ermöglicht. Hulett, H. R. und Mitarb. (1973).

3.4.1. Das Immunologische System
Es gibt internationale, offizielle Organisationen, die Referenzstandards bestimmter Reagenzien (sog. Kits oder Sets) entwickelt haben. Folgende Referenzlabors der WHO seien genannt: Medical Research Council-Division of Biological Standards in London; Statens Serum Institut in Kopenhagen; Statens Bakteriologiske Laboratorium in Stockholm; Biological Stain Commission in Rochester N. Y. und Reagents Section of the Center for Disease Control (CDC) in Atlanta, Ga.

Zum immunologischen System zählen: Antigen, Antiserum und Konjugat. Es gibt zahlreiche definierte Richtlinien und Deklarationen bezüglich der Herstellung und Anwendung, u.a. Wick, G. und Beutner, E. K. (1969); Wick, G. (1971); Wick, G. und Mitarb. (1976).

3.5.1. Die Versuchstechnik

Zur Erhaltung reproduzierbarer Testergebnisse ist es unbedingt erforderlich, den Immunfluoreszenztest immer unter den gleichen Versuchsbedingungen durchzuführen.

Folgende Faktoren müssen standardisiert sein:

1. die Temperatur, bei der die Teste durchgeführt werden;
2. die Zeit, in der die immunologischen Reaktionen ablaufen;
3. das Ablesen der Testergebnisse;
   Denk, H. und Kovac, W. (1976)

4. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Mikrobiologie
nach Wick, G. und Mitarb. (1976)

In der Bakteriologie hat die Immunfluoreszenzmethode nicht nur im Bereich der Grundlagenforschung eine große Bedeutung erlangt, sie ist vielfach zur Routinemethode geworden für die Diagnostik vieler Infektionskrankheiten. Es werden heute bereits eine Reihe käuflicher Reagenzien (Kits) angeboten für die bakteriologische und virologische Diagnostik, z. B. der FTA-Test (Fluoreszenz-Treponemen Antikörpertest), Schweinsberg, H. (1971).
Es lassen sich zwei prinzipielle Untersuchungsmethoden durchführen:

1. Die Analyse eines Antikörpers unbekannter Spezifität unter Verwendung eines Antigenpräparates bekannter Spezifität (Bakterienausstrich, viral infizierte Zellkultur).
2. Die Analyse von Mikroorganismen in einem zu untersuchenden Präparat mit Antikörpern bekannter Spezifität-

Neben der wesentlichen Verkürzung der Untersuchungszeit hat sich die Fluoreszenzserologie dadurch bewährt, daß sie große diagnostische Sicherheit in Fällen gewährleistet, wo Kultur oder klassische Färbung versagen, Wick, G. und Mitarb. (1976). Antibiotika - oder anderweitig geschädigte Mikroorganismen, die nicht mehr vermehrungsfähig sind und daher auch nicht mehr kulturell nachweisbar sind, können fluoreszenzserologisch meist spezifisch diagnostiziert werden. Es gelingt auf diese Weise noch nachträglich ein Erregernachweis, wenn in akutbedrohlicher Krankheitssituation ohne vorherige bakteriologische Untersuchung eine Antibiotika-Therapie eingeleitet wurde, Wick, G. und Mitarb. (1976)
Auch in Fällen, in denen eine starke Begleitflora die kulturelle Untersuchung hindert oder wenn anspruchsvolle Erreger nachzuweisen sind, gewährleistet die Immunfluoreszenztechnik sichere und beweiskräftige Ergebnisse, Wick, G. und Mitarb. (1976).
Es soll im folgenden weniger über die standardisierten und gut eingeführten fluoreszenzserologischen Methoden berichtet werden als über die Immunfluoreszenztechniken im Routinebetrieb einer Kinderklinik, die neue Wege der Diagnostik von Infektionskrankheiten erschließen können.

4.1. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Bakteriologie

4.1.1. Bordetella pertussis

Die Keuchhustenerkrankungen haben in den vergangenen 20 Jahren eine Pathomorphose erfahren: Mortalität und Letalität nahmen deutlich ab, die Krankheitserscheinungen haben eine mildere Verlaufsform, Ehrengut, W. und Mitarb. (1975/76). Diese Entwicklung und die Analyse der Impfzwischenfälle haben die ständige Impfkommission des Bundesgesundheitsamtes im Jahre 1974 dazu veranlaßt, in Zukunft keine kostenlosen Keuchhustenschutzimpfungen auf öffentlichen Impfterminen mehr anzubieten. Eine exakte und spezifische Labordiagnostik ist daher eine epidemiologische Forderung, Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966), um die Kinder mit noch symptomloser Erkrankung zu entdecken. Nur vom klinischen Bild her ist eine wirklich frühzeitige Diagnose kaum möglich; erst ab der zweiten bis dritten Krankheitswoche erlauben die typischen Paroxysmen eine Diagnose, Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Das Blutbild ist ein wenig verläßliches diagnostisches Kriterium, da selbst bei klinisch typischen Hustenanfällen oft eine Leukozytose mit Lymphozytose vermißt werden, Klimt, F. (1961); Eichlseder, W. (1962 u.1963). Die Isolierung des Erregers und der Nachweis von Antikörpern im Patientenblut sind unter erheblichen Schwierigkeiten zeitraubend und nur mit beschränktem diagnostischen Wert durchzuführen, Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Angesichts dieser Tatsachen erscheint die fluoreszenzserologische Färbemethode das geeignete Nachweisverfahren zu sein.

Die Krankheit wird von drei Erregern der Bordetella-Gruppe ausgelöst, die dem klinischen Bilde nach nicht voneinander abgegrenzt werden können, Lautrop, H. (1960):

1. Bordetella pertussis in ca. 90 % der Fälle (Lacey, B. W. (1960))
2. Bordetella parapertussis in ca. 5 % der Fälle (Lautrop, H. (1960); Lacey, B. W. (1960))
3. Bordetella bronchiseptica in ca. 0,1 % der Fälle (Lacey, B. W. (1960))

In nur wenigen Arbeiten ist über die Immunfluoreszenztechnik als Nachweisverfahren dieser Erreger berichtet worden;

bei de Repentigny, J. und Frappier, A. (1956) über Grundlagenforschungen zur Antigenlokalisation in der Bakterienkapsel von Bordetella pertussis.

Für die pädiatrischen Belange werden diese Untersuchungen erst durch ihre Anwendung für den direkten Immunfluoreszein-Keimnachweis aus dem Nasen-Rachensekret keuchhustenverdächtiger Kinder relevant. Erste Erfahrungen wurden mitgeteilt von: Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960); Whitacker, J. A. und Mitarb. (1960); Kendrick, P. L. und Mitarb. (1961); Marie, J. und Herzog, (1962); Marie, J. und Mitarb. (1963); Holwerda, J. und Eldering, G. (1963).

Materialgewinnung

Ocklitz, H. W. und Hahn, M. (1964) erwähnen die verschiedenen Methoden, die zur Gewinnung von Untersuchungsmaterial empfohlen worden sind, in verkürzter Form zitiert: Der herausgewürgte Schleim (Bordet, J. und Gengou, O.); die Hustenplatte, (Chievitz, J. und Meyer, A. H.); der nasopharyngeale Abstrich mittels langem, biegsamem Watteträger (Bradford, W. L.; Slavin, B.; Brooks, A. M.); der supralaryngeale Abstrich (Bodgan, A.); der postnasale Abstrich (Cruickshank, R.). Erst durch die Einführung der Katheterentnahmetechnik im Jahre 1939 durch Auger in Toronto, aufgegriffen von Silverthorne, N. 1945 und endgültig ausgebaut von Herzog, R., Marie, J. und Gaiffe, M. wurde eine ergiebige Materialgewinnung erzielt. (Zitatende).

Die Sekretentnahme erfolgt nach Empfehlungen von Herzog, F. und Mitarb. (1958) durch Aspiration mittels einer Nasensonde. Nach Möglichkeit werden die Untersuchungen vor der ersten Mahlzeit durchgeführt (Lautrop, H. (1960)). Ocklitz, H. W. und Hahn, M. (1964) verwenden Nelatonkatheter von 6-8 Charriére; der Katheter wird an eine Spritze von 20 oder 50 ml gesetzt; das von Herzog, F. und Mitarb. (1954) angegebene Zwischenstück wird nicht benutzt.

Die Hustenplatte wurde jedoch nicht völlig verdrängt, sie hat den Vorteil der leichten Handhabung und der Möglichkeit, daß sie versandt werden kann, Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Ocklitz, H. W. und Hahn, M. (1964) untersuchen die Patienten an drei aufeinanderfolgenden Tagen und beginnen - wenn es der Krankheitszustand des Kindes zuläßt - erst nach diesen drei Abnahmetagen mit der antibiotischen Behandlung. Zur Verhinderung der homogenen und unspezifischen Anfärbung der zähen Schleimmassen mit dem Fluoreszenzfarbstoff und der dadurch hervorgerufenen Überstrahlung der 0,5 µ kleinen Pertussiserreger hat sich die Verflüssigung und Konzentrationsmethode mit Trypsin als geeignet erwiesen, Lynch, jr., H. J. und Plexico, K. L. (1962).

Köditz, H. und Wagner, M. (1964) erreichen mit diesem Verfahren gegenüber dem unbehandelten Sekret eine höhere Nachweisquote. Das aspirierte Nasen-Rachen-Sekret wird mit der doppelten Menge einer 0,5 %tigen phosphatgepufferten Trypsinlösung gemischt und im Wasserbad (37 °C) unter ständiger Bewegung bis zur Verflüssigung inkubiert (15 - 30 min). Anschließend wird zentrifugiert und das Sediment auf mehrere Objektträger ausgestrichen. Nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) wird die Verflüssigung in gleicher Weise mit phosphatgepufferter 1 %tiger Rohstreptodornaselösung (Gemisch von Desoxyribonucleasen im Überstand einer A-Streptokokkenkultur) unter Zusatz von 0,03 m Mg^{+++} erreicht.
Einen Unterschied in der Nachweishäufigkeit zwischen der Trypsin- und Desoxyribonuclease-Einwirkung können Köditz, H. und Wagner, M. (1964) nicht feststellen. Die Autoren halten die Kombination beider Enzyme wegen zu starker Aktivität für nicht geeignet, die Nachweisrate der Erreger zu erhöhen, sie bringt gegenüber dem unbehandelten Sekret keine Vorteile.

Antiseren

Zur Serumgewinnung werden geeignete Bordetella pertussis-Stämme unterschiedlicher Herkunft - Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964); Köditz, H. und Wagner, M. (1964), entweder auf Kaseinhydrolysat - Kohlenährboden, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) - oder auf Bordet-Gengou-Platten überimpft. Durch Abschwemmung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,6 % einer 30 %tigen Formalinlösung wird nach Köditz,

H. und Wagner, M. (1964) eine Vaccine hergestellt. Nach Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) wird der Bakterienrasen nach der Bebrütung mit kalter physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. durch mehrere Lagen sterilen Mulls filtriert und mit dem Pyrexglasstandard für Pertussis auf ca 10 Milliarden Keime/ml eingestellt. Dazu kommt Merthiolat in einer Verdünnung von 1 : 20 000. Kaninchen erhalten nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) von dieser Vaccine innerhalb von 5 - 8 Wochen 10 - 15 intravenöse Injektionen von 0,5 ml auf 3,0 ml ansteigende Mengen. Dies entspricht auch der Methode nach Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964). Etwas komplizierter ist nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) die Herstellung von spezifischen Antiseren, da Kaninchenseren häufig Antikörper gegen Staphylokokken enthalten (Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960); Whitacker, J. A. und Mitarb. (1960) Kendrick, P. L. und Mitarb. (1961); Holwerda, J. und Eldering, G. (1963), wodurch eine Absorptionsvehandlung mit Staphylokokkenzellen notwendig wird. Holwerda, J. und Eldering, G. (1963) benutzen mit besserem Erfolg Antiseren von Hühnern. Acht Tage nach Abschluß der Immunisierung, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) oder nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) bei einem Agglutinationstiter von mindestens 1:6400 (Probepunktion) werden die Kaninchen entblutet. Nach Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) wird das auf diese Weise nach Zentrifugieren und Konservierung mit Merthiolat hergestelllte Serum bei +4 °C aufbewahrt.

Fluoreszenz-Markierung

Zur Fluoreszenz-Markierung kann nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) bei hochtitrigem Serum direkt vom Vollserum ausgegangen werden, ebenso Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964). Eine vorherige Abtrennung der Globulinfraktion als Trägerin der Antikörperproteine muß hingegen bei niedrigtitrigen Seren vorgenommen werden, bevor die Konjugation erfolgen kann, Ocklitz, H. und Weppe, Ch.-M. (1964). In der Literatur werden zahlreiche Abtrennungsverfahren angegeben - zitiert nach Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) - : U. A. Fällung mit Äthylalkohol (Cohn), modifiziert von Deutsch, oder mit Methanol (Pillemer); mit Rivanol (Vodrazka); die Verwendung von Natriumsulfat (Cohen) oder

Ammoniumsulfat (Jager). Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) vergleichen die Fällung mit Äthylalkohol und mit Ammoniumsulfat. Beide Methoden bringen die gleichen Färbeergebnisse. Da die Ammoniumsulfatfällung einfacher durchzuführen ist, erscheint den Autoren dieses Abtrennungverfahren die Methode der Wahl zu sein.

Die Konjugation der Serumproteine gelingt am besten mit Fluoreszenzeinisothiozyanat (FITC), Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Die Markierung mit anderen Farbstoffen wie Isozyanat oder 1-Dimethylaminonaphtalin-5-sulfochlorid (DIS), Mayersbach, H. (1958), dessen Verwendung sich für den fluoreszenzserologischen Nachweis pathogener Colitypen bewährt hat, Köditz, H. und Weinert, A. (1960), erwiesen sich für die Darstellung von Bordetella pertussis als unbrauchbar, Köditz, H. und Wagner, M. (1964); Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964). Die Konjugation der Serumproteine mit FITC kann nach der von Marshall, J. D. und Mitarb. (1958) angegebenen und von Wagner,M. und Heinrich, H. (1962) modifizierten Methode ausgeführt werden: 5 ml Serum werden mit der fünffachen Menge phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2 bis 7,4) vermischt und im Eisbad gekühlt.
Ebenso geeignet sind Veronal - NaCl - Puffer, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) oder NaCl - Bicarbonat - Puffer, Marshall, J. D. und Mitarb. (1958), Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) empfehlen als optimale Einstellung des Serums 15 mg Eiweiß pro ml Kopplungsgemisch - .
Mit einigen Tropfen einer m/2 Sodalösung wird nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) auf pH 9,0 eingestellt und anschließend 16,8 mg FITC in kristalliner Form zugegeben. Durch langsames Vermischen mit Hilfe eines Rührwerks wird der Farbstoff bei 4 ^{o}C im Verlauf von 16 - 20 Stunden gelöst.

Reinigung des Konjugates

Um unspezifische Färbung zu vermeiden, muß der ungebundene Fluoreszenzfarbstoff entfernt werden, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) vergleichen folgende Methoden: Dialyse, Filtration mit dem Ionenaustauscher Dowex, Gelfiltration mit Sephadex -g-50; ferner Ausschütteln des Gemisches mit Bakterienpulver, mit Leberpulver und mit Kohlepulver, Literatur bei Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964).

Die Filtration mit Sephadex erweist sich als die schnellste und gründlichste Methode, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964); bestätigt wird dieses Vergleichsergebnis durch die Arbeiten von Wagner, M. (1962), sowie Wagner, M. und Heinrich, H. (1962). Dieses Reinigungsverfahren trägt außerdem nur geringe Titerverluste ein, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964). Falls eine Nachbehandlung erforderlich ist, um die immer noch vorhandenen letzten Spuren freien Farbstoffes zu entfernen, bewährt sich nach Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) das Ausschütteln mit Leberpulver am besten. Nach Wagner, M. (1962) kann durch die Gelfiltration an Sephadex-G-50 eine quantitative Entfernung des freien Farbstoffes sowie Einstellung auf pH 7,2 bis 7,4 in wenigen Minuten erreicht werden. Das Serum erfährt dabei nur einen geringen Konzentrationsverlust, Köditz, H. und Wagner, M. (1964).

Prüfung des Konjugates

Die Prüfung des Konjugates auf Spezifität und Titerhöhe wird von den Autoren für dringend erforderlich gehalten, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964); Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Mit verschiedenen Sammlungsstämmen anderer Spezies läßt sich die Spezifität der Konjugate gegen Bordetella pertussis prüfen. Nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) treten nur mit Bord. bronchiseptica starke Kreuzreaktionen auf, ein Befund, der von anderen Autoren bestätigt wird, Eldering, G. und Mitarb. (1962). Eine Absorption ist nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) wegen der damit verbundenen Schwächung des homologen Titers nicht ratsam, außerdem diagnostisch bedeutungslos.
Bord. parapertussis, Hämophilus imfluenzae und verschiedene Staphylokokkenstämme werden nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964); Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) nicht angefärbt. Ferner reagieren die markierten Parapertussis-Antiseren nicht entsprechend mit den anderen Bordetellaspezies, Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) stellen einen Titerabfall bei der Kopplung des Serums mit dem Fluoreszenzfarbstoff fest, ferner bei der anschließenden Entfernung des ungebundenen Farbstoffes, wobei - wie oben angedeutet - der Einsatz von Sephadex-G-50 in dieser Hinsicht die besten Resultate erzielt, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964).

Anfertigung der Präparate

Als beste Fixierungsmittel bei der flureszenzserologischen Pertussisdiagnostik erweisen sich nach Untersuchungen von Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964): Azeton, Methanol oder Boinsche Lösung.Da Hitzefixierung die Bakterien deutlich schädigt, ist die Fixierung mit Methanol oder besonders mit Azeton in Kälte vorzuziehen, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964). Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960) betonen noch den Vorteil, daß damit gleichzeitig autofluoreszierendes Material entfernt wird.
Die vorbehandelten Objektträgerausstriche - nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964):
Azetonfixierung 10 min , nach Abspülen mit Aqua dest. Lufttrocknung werden mit dem jeweiligen markierten Antiserum überschichtet - mit einer Pipette 0,1 ml aufgetropft nach Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch. -M. (1964) - und 30 min in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur inkubiert, Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Für Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) ergeben sich 60 min als optimale Dauer der Anfärbung; Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960) und Marie, J. und Mitarb. (1963) empfehlen 20 min. Nach anschließendem Waschen mit Pufferlösung (10 min) werden die noch etwas feuchten Präparate mit Glycerin-Phosphat-Kochsalzpuffer (9:1, pH 7,0) und einem Deckglas bedeckt, Köditz, H. und Wagner, M. (1964). Kendrick, P. L. und Mitarb. (1961) erwähnen eine Gegenfärbung der Ausstriche mit normalem fluorochromiertem Rinderserum; die Fluorochromierung erfolgt mit rhodamine RB 200 in einer Verdünnung von 1:20. Es sollen auf diese Weise bessere Kontraste erreicht werden, die das Erkennen der Bordetellen vereinfachen.

Fluoreszenzmikroskopie

Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960); Marie, J. und Mitarb. (1963) und auch Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) halten es für wichtig, die untersuchten Präparate nicht nur mit „positiv" oder„negativ" zu etikettieren, sondern darüber hinaus anzugeben, wieviel Bordetellen gefunden wurden.
Zusätzlich sollten die Vergrößerung und die Zahl der Gesichtsfelder vermerkt werden.

Als „positiv" werden nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) die Ausstriche gewertet, die kurze, kokkoide Stäbchen mit deutlich fluoreszierender Konturenverstärkung auf dunklem Grund zeigen. Diese Konturenverstärkung gilt allgemein als beweisendes Merkmal für eine positive Immunfluoreszenz bei Bakterien, Köditz, H. und Wagner, M. (1964).

Bemerkungen

Nach Lautrop, H. (1960) ist eine gleichzeitige Infektion mit Bord. pertussis und Bord. parapertussis keineswegs selten, nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) sind es 7 % auf die Gesamtzahl bakteriologisch positiver Keuchhustenfälle bezogen.
Zum Nachweis dieses Infektionsmodus werden nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964) die Objektträgerausstriche nicht nur mit markiertem Antipertussisserum, sondern zugleich auch mit markiertem Antiparapertussisserum untersucht. Da zwischen diesen beiden Erregern keine Kreuzimmunität besteht, Köditz, H. und Wagner, M. (1964), hat diese diagnostische Möglichkeit insofern Bedeutung, als für Kinder nach einer nicht erkannten Parapertussisinfektion, die klinisch als Pertussis verlief, immer die Gefahr besteht, von weiteren prophylaktischen Maßnahmen gegen Pertussis ausgeschlossen zu werden und auf diese Weise ein zweites Mal an Keuchhusten zu erkranken, daß frisch isolierte Kulturen von Bord. pertussis nicht eine homologe serologische Gruppe bilden, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964), Literatur bei Kendrick, P. L. und Mitarb. (1961); Lautrop, H. (1960).
Zwar gibt es noch kein komplettes, allgemein gültiges Antigenschema, doch soviel läßt sich nach Darstellung von Lautrop, H. (1960) zusammenfassend sagen: bei den Bordetellen lassen sich drei verschiedene Antigenarten unterscheiden: daß Geißel- oder H-Antigen, das hitzestabile O-Antigen und die relativ hitzelabilen K-Antigene. Das H-Antigen findet sich nur bei Bord. bronchoseptica, das O-Antigen scheint allen Bordetellen gemeinsam zu sein. Jeder Stamm verfügt aber offenbar über einen Komplex aus mehreren K-Antigenen, die aus einem sog. Haupt- und mehreren Neben-K-Antigenen bestehen. Das Haupt-K-Antigen soll allen Stämmen einer Spezies gemeinsam sein.

Eine Fehlerquelle kann die unspezifische Anfärbung von Staphylokokken sein. In den Arbeiten von Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960) und Marie, J. und Mitarb. (1963) wird auf dieses Phämomen besonders hingewiesen. Über das Problem, daß Kaninchen, ehe sie zur Herstellung von Antipertussisserum herangezogen werden, gegen andere Keime vorimmunisiert sein können, wurde oben berichtet. Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) weisen darauf hin, das Serum im Ansatz auch gegen andere Bakterien, besonders gegen Staphylokokken zu überprüfen, bevor es zur Pertussisdiagnostik verwandt wird.

Die Bedeutung der Fluoreszenzserologie in der Pertussisdiagnostik

Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse verschiedener, wiederholt genannter Autoren bestätigt übereinstimmend, daß sich die Methode des direkten Nachweises von Antigen unter Verwendung spezifischer fluoreszenzmarkierter Antikörper für die bakteriologische Pertussisdiagnostik eignet und besondere Vorteile in sich vereint:

1. Die fluoreszenzserologische Methode ist spezifisch und einfach in der Technik, Köditz, H. und Wagner, M. (1964).
2. Die Immunfluoreszenztechnik arbeitet schnell: von der Schleimentnahme bis zum Befund vergehen 2 Stunden, bei der Kultur mindestens 3 oder gar 6 Tage, nach Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1964).
3. Die Immunfluoreszenzmethode weist eine höhere Nachweisquote gegenüber der kulturellen Bestimmung auf, Köditz, H. und Wagner, M. (1964).
4. Die Wirtschaftlichkeit der Fluoreszenzmethode ist hervorzuheben: ohne großen apparativen Aufwand lassen sich Markierung der Seren als auch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung in jedem Labor durchführen, Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964).

Alle aufgeführten Autoren betonen übereinstimmend, daß die fluoreszenzserologische Methode mehr positive Befunde liefert als die kulturelle Keimbestimmung. Der Prozentsatz der positiven Befunde bezieht sich auf Keuchhustenverdachtfälle oder Erkrankungen der ersten 3 Wochen. Nach diesem Zeitpunkt sinkt die Nachweisrate nach Angaben der genannten Autoren deutlich ab. Der besondere Vorteil liegt in der Früherkennung der Pertussis, wobei aber besonders zu betonen ist, daß nach Köditz, H. und Wagner, M. (1964), sowie Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1964) die Aspiration größerer Sekretmengen mit enzymatischer Verflüssigung und der Möglichkeit der Anreicherung zu den besten Ergebnissen führt. Köditz, H. und Wagner, M. (1964); Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960); sowie Marie, J. und Herzog, F. (1962) konnten bei gesunden Kontaktpersonen aus der Umgebung keuchhustenerkrankter Kinder Pertussiserreger nachweisen. Die Kenntnis gesunder Keimträger ist insofern wichtig, da diese epidemiologisch nicht vernachlässigt werden dürfen.
Im Gegensatz zu folgenden Autoren: Donaldson, P. und Whitacker, J. A. (1960); Whitacker, J. A. und Mitarb. (1960); Marie, J. und Herzog, F. (1962) machen Köditz, H. und Wagner, M. (1964), sowie Ocklitz, H. W. und Weppe, Ch.-M. (1964) die übereinstimmende Feststellung, daß sich mit Antibiotika abgetötete Keime zwar nicht mehr anzüchten, jedoch ebensogut wie lebende fluoreszenzserologisch erfassen lassen. Mit Hitze abgetötete Keime hingegen sind mit beiden Nachweismethoden nicht mehr zu identifizieren, Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1964).

Radionuclid und Fluoreszenzfarbstoff in der Markierung von Antikörpern gegen Bord. pertussis

Der Einsatz der Immunfluoreszenztechnik bei der Überwachung von Krippen und Heimen könnte nach Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966) trotz der Wirtschaftlichkeit dieser Labormethode bald an die Grenzen der Kapazität in den Laboratorien stoßen. Dieses Problem provozierte die Erforschung neuer, rationellerer Untersuchungs- und Auswertungsmethoden. Von Bedeutung ist die Radionuclid-Globulin-Markierung, Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966). Die genannten Autoren untersuchen diese Methode, bei der die Fluoreszenzfarbstoff-Proteinkopplung durch eine Radionuclid-Markierung der

spezifischen Antikörperfraktion und der mikroskopische Nachweis durch die Impulszählung ersetzt werden. Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966) markieren die durch Immunisierung gewonnenen Antikörper mit trägerfreier Na J^{131} -Lösung und verwenden zur Freisetzung des J^{131} Chloramin T. Mit dieser Methode wird eine Steigerung der spezifischen Aktivitäten um das fast 500fache und eine Steigerung der radioaktiven Konzentration auf das rund 3fache erzielt im Vergleich zu früheren Modifikationen dieser Radionuclidmethode, Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966). Im direkten Vergleich der Radionuclid- mit der Fluoreszenzfarbstoffmarkierung stellen Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966) fest, daß beide Nachweismethoden spezifisch sind; daß die Radionuclidmethode jedoch in der Empfindlichkeit des Pertussisnachweises hinter der Fluoreszenzmethode zurücksteht. Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1966) geben mögliche Verbesserungen an zur Lösung der dieser Nuclidmethode eigenen Problematik.

4.1.2. Enteropathogene Coli-Bakterien -
- Dyspepsie-Coli-Diagnostik -

Enteropathogene, säuglingspathogene Escherichia coli (E. coli) , Enteritis coli oder Dyspepsie coli (DC) waren in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Publikationen.
Whitacker, J. und Mitarb. berichten 1958 über Erfolge mit fluoreszenzserologischen Untersuchungen von enteropathogenen Coli-Bakterien. 1960 erweiterten Nelson, J. D. und Mitarb. diese frühen Arbeiten. Die Vorteile des fluoreszenzserologischen Nachweises von DC-Bakterien wurden von zahlreichen anderen Forschern festgestellt, u. a. Bertrams, P. und Mitarb. (1970); Bösenberg, H. (1968); Chadwick, P. (1966); Cherry, W. B. und Mitarb. (1961); Cohen, F. und Mitarb. (1961); Danielsson, D. und Laurel, G. (1961); Gebert, P. (1964); Huth, E. und Schleihauf, T. (1965); Martinau, B. (1962); Page, R. H. und Stuhlberg, C. S. (1962); Refai, M. und Rohde, R. (1965); Reimers, E. (1962); Shaughnessy, H. J.und Mitarb. (1962); Thomason, B. M. und Mitarb. (1961); Whitacker, J. und Mitarb. (1958).
Diese Vorteile des Fluoreszenztestes liegen sowohl in der Schnelligkeit als auch in der Zuverlässigkeit dieses Verfahrens, und übereinstimmend berichten alle Autoren von einer Mehrausbeute von positiven DC-Befunden im Vergleich zur Kultur, nach Heinrich, S.

und Burckhardt, F. (1971), z. B. um 6 %; Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970); Nelson, J. D. und Mitarb. (1960); Thomason, B. M. und Mitarb. (1961); Page, R. H. und Stuhlberg, C. S. (1962); Reimers, E. (1962); Shaughnessy, H. J. und Mitarb. (1962); Gebert, P. (1964). Die unterschiedliche prozentuale Erfolgsquote ist nach den Angaben von 15 Autoren über ihre Beobachtung im Verlauf von 13 Jahren (1957-1970) aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1:

Autor und Land	Jahr	FAT positiv %	Versager	Kulturell positiv %	Versager	DC-Typen
Poetschke und Mitarbeiter (Deutschland)	1957	11,1		7,1		
Petuely und Lindner (Deutschland)	1958	11,11		7,25		0111 : B4 0 26 : B6
Kabanova und Mitarbeiter (UdSSR)	1960	40,13		29,25		
Nelson (USA)	1960	19,4 7,1		15,8 6,2		
Köditz (Deutschland)	1960	64,3		35,7		
Thomason und Mitarbeiter (USA)	1961	38,76		29,51		
Cohen und Mitarbeiter (USA)	1961		5,8		6,9	
Cherry und Mitarbeiter (USA)	1962	36,42		24,74		
Reimers (Deutschland)	1962	34,0		9,3		
Reimers (Deutschland)	1963	79,5		13,2		
Gulmezoglu (Türkei)	1963	14,3		2,5		0 85 : B5 0111 : B4

Tabelle 1:

Autor und Land	Jahr	FAT positiv	Versager	Kulturell positiv	Versager	DC-Typen
Gebert (Deutschland)	1964	4,0		36,0		0111 : B4 0 55 : B5 0127 : B8
Mardsen und Mitarbeiter (England)	1965	6,0		4,33	1,66	
Geck und Mitarbeiter (Ungarn)	1966	78,9	21,1	22,8	77,2	0111 : B: 34
Linzenmeier u. Mitarb. (Deutschland)	1970		2,8		13,2	
Trüb, Boese u. Posch (Verf.) (Deutschland)		54,63		45,37		

Diese Korrelationen aber besagen alleine wenig, wenn nicht gleichzeitig der klinische Schweregrad der Erkrankung berücksichtigt wird. Nach Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) und Gebert, P. (1964) zeigt sich dann eine besondere Dominanz der durch Immunfluoreszenz nachgewiesenen DC bei den sog. leichten Dyspepsien. In der Praxis bedeutet dies, daß bei harmloser erscheinenden Krankheitsbildern - evtl. in Abhängigkeit von der Keimzahl - die Kultur ein weniger befriedigendes Ergebnis liefert; eine Tatsache, die bei den epidemiologischen und therapeutischen Maßnahmen zu berücksichtigen ist, Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970).
Von Trüb, P. und Mitarb. (1970) wird die Immunfluoreszenztechnik der direkten Färbung der Antigene durch die mit Fluoreszein - Isothiozyanat markierten spezifischen Antikörper angewandt. Die Erstuntersuchung nimmt Trüb, P. und Mitarb. (1970) mit der sog. „einfachen Stuhlverdünnung" vor, da es auf die Schnelligkeit der diagnostischen Erfassung bei Erkrankungsverdacht ankommt. Das Testergebnis können Trüb, P. und Mitarb. (1970) bereits nach zwei Stunden ablesen. Unklare Ergebnisse nach gesicherter Diagnose lassen sich nach Trüb, P. und Mitarb. (1970) dann mit dem kombinierten Anreicherungsfluoresrezenzverfahren, dem „verzögerten-" Immunfluoreszenzverfahren nachprüfen. Bei dieser Methode wird das Untersuchungsgut erst 12 bis 20 Stunden in Bouillon bebrütet, danach wird das Sediment fluoreszenzoptisch untersucht. Das direkte Verfahren mit der einfachen Stuhlverdünnung hat sich nach Trüb, P. und Mitarb. (1970) für die Aufgaben der DC-Hospitalismusbekämpfung sehr gut bewährt. Vorteilhafter jedoch arbeitet man nach Trüb, P. und Mitarb. (1970) mit zwei verschiedenen Stuhlverdünnungen, da dadurch die positive Ergebnisausbeute größer sein kann. Ein wichtiges diagnostisches Kriterium ist nach Trüb, P. und Mitarb. (1970) das besonders starke Aufleuchten des Randes der Bakterien, während der Bakterienleib selbst eine deutlich geringere Fluoreszenz aufweist. Ebenfalls ist die Bakterienform für die diagnostische Beurteilung ausschlaggebend, Trüb, P. und Mitarb. (1970). Die Immunfluoreszenzmethode kann nach Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) nur eine „Suchmethode" sein; da sie auch die nicht vermehrungsfähigen Keime erfaßt, bleibt bei positiven Befunden das Anlegen einer

Kultur nicht erspart. Nur die Kultur kann die differentialdiagnostische Frage: Rezidiv oder Neuinfektion beantworten, Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970). Obwohl Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) bei positiven Immunfluoreszenzbefunden noch zusätzlich die Kultur fordern, ergibt sich nach diesen Autoren im ganzen gesehen doch als Folge der Suchmethode eine erhebliche Einsparung vom Arbeitskraft und Arbeitsmaterial. Denn fällt der Immunfluoreszenztest negativ aus wie bei der Mehrzahl der Fälle, so kann auch auf die aufwendige und zeitraubende Kultur verzichtet werden, Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970).
Die Erfolge der Immunfluoreszenz sind unmittelbar abhängig von der Qualität der verwendeten Seren, Schmidt, E. F. und Markuse, I. (1966). Die Autoren weisen auf Fehlermöglichkeiten hin und auf die Notwendigkeit, sie zu beseitigen. Es muß sichergestelllt sein, daß ausreichend einwandfreie gekoppelte und genau deklarierte Seren im Handel zur Verfügung stehen, Schmidt, E. F. und Markuse, I. (1966). Durch Verwendung ungeeigneter Seren mit niedrigem Eiweißgehalt, O - statt OK-Seren und durch Fehler in der technischen Durchführung werden die genannten Vorteile der Immunfluoreszenz zunichte gemacht, Reimers, E. (1962), Ewing, W. H. und Edwards, P.-R. (1954), Thomason, B. M. und Mitarb. (1961).
Wie oben ausgeführt, stellt die Immunfluoreszenz eine Suchreaktion dar. Wendet man sie alleine an, so bedeutet das einen Verzicht auf weitere biologisch-serologische Diagnostik. Es genügt nicht die Feststellung des OK-Typs, es muß sich vielmehr zur Bearbeitung jeder wissenschaftlichen Fragestellung die Identifizierung der O-, K- und H-Antigene einzeln anschließen, Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970). Außerdem gehören die Feststellung des Biotyps sowie das Antibiogramm zur vollständigen Untersuchung, beide sind nur durch Anwendung der kulturellen Methode möglich, Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970). Nur dadurch können nach Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) der klinischen und epidemiologischen Auswertung die notwendigen Daten geliefert werden und evtl. andere Enterititiserreger außerhalb der DC-Gruppe und neue, unbekannte DC-Typen erfaßt werden.

Was Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1964) für die Anwendung der Immunfluoreszenz bei der Pertussis-Diagnostik hervorheben, gilt nach Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) und Schmidt, E. F. und Markuse, I. (1966) auch für DC-Befunde: durch therapeutische Maßnahmen bereits veränderte Keime mögen zwar nicht mehr anzüchtbar sein, sie sind jedoch fluoreszenzserologisch noch gut zu erfassen. Die Immunfluoreszenz bleibt trotzdem eine „Suchmethode", und jeder mit dieser „Suchmethode" erhobene Befund verlangt nach Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) das Anlegen einer Kultur. Das gilt für die Sanierungskontrolle und auch besonders für die Umgebungsuntersuchungen, Schmidt, E. F. und Markuse, I. (1966). Eine Indikation zur antibiotischen Therapie sehen Schmidt, E. F. und Mitarb. (1970) stets nur dann gegeben, wenn das Fluoreszenzergebnis auch kulturell bestätigt wird.
Häufig ist es problematisch, trotz klinischer Heilung die Stühle zu sanieren, d. h. frei von enteropathogenen E. coli zu bekommen, Raue, W. (1968). Die Hauptursache für das Versagen der Therapie ist die zunehmende Resistenz der Erreger gegenüber den Antibiotika. Daher ist es erstrebenswert, vor Beginn der Therapie das optimal wirksame Medikament zu eruieren, Raue, W. (1968).
Raue, W. (1968) geht der Frage nach, ob aus der Stärke der Fluoreszenz oder der Form der Keime eine Schädigung durch die Medikamente abgeleitet werden kann. Es zeigt sich, daß ein Nachlassen der Fluoreszenzkraft unter antibiotischer Therapie nicht mit einer Keimschädigung gleichzusetzen ist, Raue, W. (1968). Diese fluoreszenz-optischen Veränderungen sind auch bei vermehrungsfähigen und damit infektiösen DC-Keimen zu beobachten, Raue, W. (1968). Aus diesem Grunde ist die Immunfluoreszenz zur Überwachung einer antibiotischen Therapie nicht geeignet, Raue, W. (1968)! Auch Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) kommen auf Grund ihrer Untersuchungen zu dieser Aussage. Diese Autoren stellen ferner fest, daß kein durch ein besonderes H-Antigen charakterisierter Enteritiscoli-Stamm mehr als andere Stämme mit anderen H-Antigenen der Sanierung entgehen. Unterschiede in der Antibiotika-Resistenz - so teilen die Autoren mit - korrelieren innerhalb der gleichen O-Gruppe nicht mit einem durch ein besonderes H-Antigen charakterisierten Enteritis coli.

Dagegen ergeben sich nach Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) signifikante Unterschiede zwischen H-Typ und Resistenz je nachdem, ob die Stämme bei der Aufnahme oder als „Klinik-Stämme" angezüchtet werden: die ersten sind wenig, die letzten stark resistent. Diese Feststellung ist einleuchtend, da eine Antibiotikaresistenz u. a. die Voraussetzung für die Entwicklung eines Erregers zum Hospitalkeim bzw. Klinikstamm sein dürfte, Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970). Daraus können - so folgern Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) - sofern die H-Antigenanalyse Anhaltspunkte für einen Hospitalkeim gibt, wertvolle Hinweise für therapeutische Überlegungen abgeleitet werden.
Als Anstaltskeim par excellence identifizieren Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) Enteritis coli mit der Formel O111 : K 58 (B4): H. Jene Autoren erkennen, daß die H-Antigenanalyse ein wichtiges Hilfsmittel ist, um beim einzelnen Säugling eine Neuinfektion von einem Rezidiv zu unterscheiden. Handelt es sich bei dem in Frage kommenden Enteritis coli um eine geißellose Variante, so muß nach Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) die H-Antigenanalyse durch eine Bestimmung des Biotyps ergänzt werden, Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) finden in einer vermeintlich einheitlichen Epidemie mit DC O111 : K 58 (B4) verschiedene H-Antigentypen. Damit aber ist der Wert der H-Antigenanalyse für die epidemiologische Arbeit noch nicht erschöpft. Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970) können mit ihrer Hilfe auch Infektionsquellen erkennen, Infektionsketten verfolgen und damit wichtige Konsequenzen für Pflege und Therapie ziehen. Schließlich ist durch die H-Antigenanalyse die Grundlage für Arbeiten an einer spezifischen Prophylaxe und eines Impfstoffes gegeben. Literatur bei Ocklitz, H. W. und Mitarb. (1970); Trüb, P. und Mitarb. (1970).
Die Darstellung der beiden Hauptantigenkomplexe bei beweglichen Bakterien (O- und H-Antigene) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper wird in mehreren Arbeiten beschrieben: Thomason, B. M. und Mitarb. (1959); Strachiloff, D. und Mohr, J. (1965). Das Verfahren ist auch geeignet, die Antigenverteilung und die Neubildung von Antigen während der Zellteilung an einzelnen Keimen zu

untersuchen, wie u. a. auch am Beispiel von E. coli gezeigt werden kann, Strachiloff, D. und Mohr, J. (1965). Durch Markierung differenter Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen, die bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, können die entsprechenden Antigene in verschiedenen Farben sichtbar gemacht werden, Strachiloff, D. und Mohr, J. (1958).

4.1.3. Salmonellen

Strachiloff, D. und Mohr, J. (1965) berichten über die Anwendung der Immunfluoreszenz zur Sichtbarmachung des Geißelapparates bei verschiedenen Salmonellaspezies. Dadurch sind Untersuchungen über den Antigengehalt der Geißeln möglich. Mit Hilfe der indirekten (Sandwich-)Methode und der Anwendung qualitativ hochwertiger Seren kann der Geißelapparat von Strachiloff, D. und Mohr, J. (1965) leicht und sicher dargestellt werden. Ein Anwendungsgebiet dieser Technik besteht nach Strachiloff, D. und Mohr, J. (1965) in der Kontrolle der Herstellung zellfreier Geißelpräparate für die Serenproduktion.

Strachiloff, D. und Mohr, J. (1968) erweitern die Antigenanalyse bei einigen Salmonellen-Serotypen durch die getrennte fluoreszenzoptische Darstellung von O- und H-Antigenen mittels Antiseren, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert werden. Dafür benutzen die Autoren eine Kombination des direkten und indirekten Verfahrens der Immunfluoreszenztechnik. Zur Darstellung der O-Antigenkomplexe werden mit Lissamin Rhodamin B 200 (RB 200) markierte Anti-O-Schafseren verwendet, während die Sichtbarmachung der Geißeln mittels eines spezifischen Kaninchen-Antiserums und nachfolgender Behandlung mit Fluoreszeinisothiozyanat - markiertem Anti-Kaninchenglobulin-Ziegenserum erfolgt, Strachiloff, D. und Mohr, J. (1968): Literatur zur Markierung der Seren bei Strachiloff, D. und Mohr, J. (1968).

Diese Kontrastdarstellung von Zellen und Geißeln stellt nach Strachiloff, D. und Mohr, J. (1968) eine Erweiterung der möglichen Schnelldiagnostik mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern bei Salmonellosen dar, wofür bisher ausschließlich Fluoreszenzisothiozyanat (FITC) markierte - Anti-O, H-Seren benutzt wurden Stulberg, C. S. und Mitarb. (1966); Caldwell, W. J. und Mitarb. (1966).

4.1.4. Staphylokokken

Über die fluoreszenzserologische Diagnostik von Staphylococcus aureus berichtet Carter, Ch. H. (1959). Er benutzt mit FITC- markierte Antiseren gegen die Staphylokokken - Typen I und II und untersucht Staphylococcus aureus-Stämme, die vom Menschen, vom Tier sowie von Nahrungsmitteln isoliert werden. In allen Fällen gelingt Carter, Ch. H. (1959) eine Darstellung und eine weitgehende Übereinstimmung mit dem kulturellen Ergebnis. Smith, P.B. und Mitarb. (1962) teilen ebenfalls gute Erfahrung über den fluoreszenzserologischen Nachweis von Staphylococcus aureus mit. Ferner liegen Untersuchungen von Cohen, J. O. und Oeding, P. (1962) vor, die die serologische Typisierung des Staphylococcus aureus mit Hilfe von fluoreszeinmarkierten Antikörpern im Vergleich zur Agglutinationstechnik überprüfen. Der Nachweis der Faktoren a, b, i und k gelingt mit beiden Methoden gleich gut, während das Anti-C-Serum ein etwas breiteres und das Anti-m-Serum ein etwas schmaleres Spektrum im Fluoreszenztest aufweisen.

Schmidt, J. (1964) untersucht die Brauchbarkeit der fluoreszenzserologischen Methode im Vergleich zur kulturellen Diagnostik und zum Gram-Präparat. Als Untersuchungsmaterial dienen Eiter- und Wundabstriche, sowie Gallensäfte, Urine, Liquores und Sputum. Ein Vergleich der Resultate, die bei der Untersuchung der verschiedenen Materialien gewonnen wurden, läßt keine grundsätzlichen Unterschiede erkennen, Schmidt, J. (1964). In ca. 88 % der Fälle besteht nach Schmidt, J. (1964) eine Übereinstimmung zwischen Kultur und Fluoreszenztest, während die Versagerquote - z. T. durch unspezifische Färbung koagulasenegativer Kokken verursacht - mindestens 6 % beträgt. Die restlichen 6 % stellen Materialien dar, bei denen der isoliert positive Fluoreszenztest nach Überlegungen von Schmidt, J. (1964) im Sinne des Vorhandenseins von Staphylococcus aureus zu deuten ist.

Gegenüber der Gramfärbung erweist sich nach Schmidt, J. (1964) das fluoreszenzserologische Verfahren besonders in bezug auf die Abtrennung von Streptokokken und der Mehrzahl der koagulasenegativen Staphylokokken als deutlich überlegen.

Fluoreszenzserologisch ist also eine Identifizierung vonStaphylococcus aureus möglich, nach Schmidt, J. (1964). Die praktische Bedeutung und der Vorteil des Immunfluoreszenztestes liegen darin, daß innerhalb kurzer Zeit eine Orientierung über das Vorkommen von Staphylococcus aureus in den Untersuchungsmaterialien möglich ist, wobei die Mehrzahl der koagulasenegativen Kokken nicht gefärbt werden, Schmidt, J. (1964). Auch bei Mischinfektionen kann Schmidt, J. (1964) eine quantitative Abschätzung vorhandener pathogener Staphylokokken im Vergleich zu koagulasenegativen Kokken und anderen Bakterien vornehmen. Sind die Staphylokokken bereits abgestorben, so wird nach Schmidt, J. (1964) eine Unterscheidung von koagulasenegativen Kokken nur mit Hilfe der Fluoreszenztechnik in beschränktem Rahmen herbeizuführen sein.
Als Nachteile der Methode führt Schmidt, J. (1964) die unspezifische Färbung an; ferner die Tatsache, daß naturgemäß die Fluoreszenzmethode keine Aussage über die Antibiotikaresistenz der Erreger machen kann. Aus diesen Gründen besitzt nach Schmidt, J. (1964) die Fluoreszenztechnik bei der Diagnose von Staphylococcus aureus nur einen orientierenden Wert, und sie kann letztlich die kulturelle Züchtung nicht ersetzen.

4.1.5. Streptokokken

Erkrankungen durch Beta-hämolysierende Streptokokken der Gruppe A spielen tortz unveränderter Empfindlichkeit dieser Keime gegen Penicillin und andere Antibiotika nach wie vor eine große Rolle in der Praxis, Tiesler, E. (1975). Akute Erkrankungen der Haut, Schleimhaut, durch Bakteriämie und Organbefall können in der Regel durch Erregernachweis diagnostiziert werden. Die Gruppendifferenzierung der Streptokokken kann kulturell mit Hilfe des sogenannten Bacitracin-Tests vorgenommen werden, Petran, E. (1964); Estrela, L. A. und Shuey, H. E. (1963); Sprunt, K. und Mitarb. (1974); außerdem kann bei zweifelhaften Testergebnissen der Kulturmethode das Immunfluoreszenzverfahren angewandt werden, Petran, E. (1964); Estrela, L. A. und Shuey, H. E. (1963). Sprunt, K. und Mitarb. (1974) beschreiben einen Screening-Schnelltest zur Identifizierung von Streptokokken der Gruppe A in Mischkulturen, der in weniger als 24 Stunden die Ergebnisse liefert. Es ist eine Kombination des Bacitracin-Tests mit der Fluoreszenz-Antikörper-Technik (FA),

die in den Fällen unklarer Empfindlichkeits- und Resistenztestung auf Antibiotika angeschlossen wird. Literatur über die fluoreszenzserologische Streptokokken-Diagnostik bei oben genannten Autoren.
In der Regel ist der Antikörpernachweis gegen Streptokokkenantigene länger möglich als der Erregernachweis, Tiesler, E. (1975). Als serologische Standardreaktion galt lange Zeit die Antistreptolysin-O-Reaktion, Tiesler, E. (1975); die Durchführung von Antikörperbestimmungen gegen andere Streptokokkenantigene jedoch (Streptodornase B, Hyaluronidase und NA-Dase) ergibt spezifische Ergebnisse von erheblicherem diagnostischen und prognostischen Wert, Tiesler, E. (1975).
Anders liegen die Verhältnisse bei toxischen und sensibilisierten Folgeerkrankungen, die dem kardiorheumatischen Formenkreis zuzurechnen sind. Nach Untersuchungen von Kaplan, M. H. und Suchy, M. C. (1964) spielt bei kardiorheumatischen Folgeerkrankungen eine Antigengemeinschaft zwischen Gewebsantigenen (z. B. Endokard) und Streptokokkenantigenen (z. B. gruppenspezifisches Kohlenhydrat C) die entscheidende Rolle für die Pathogenese dieser Erkrankungen, Tiesler, E. (1975); Wachsmuth, E. D. (1970). Neben Beta-hämolysierenden Streptokokken der Gruppe A, Kaplan, M. H. und Suchy, M. L. (1964) - beschreiben von Kurnatowski, H.-A. und Mitarb. (1977) Streptokokken der Gruppe B, die als Erreger von Myokarditis bekannt worden sind, einer Myokarditis im Sinne einer Autoimmunkrankheit (siehe spätere Kapitel).
Wachsmuth, E. D. (1970) gelingt die Darstellung von gebundenem authochthonem IgG am Sarkolemm pathologisch veränderter Herzmuskulatur mit fluoreszenzmarkiertem Anti-IgG - in geringerem Umfang können IgM und Beta$_1$ C-Protein nachgewiesen werden -, ferner die Darstellung des Sarkolemms von Herzmuskulatur durch fluoreszenzmarkierte Alpha-hämolytische Streptokokken. Die Anfärbung der Immunkomplexe erfolgt mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) - markiertem Immunglobulin aus Ziegen- anti- Kaninchen- Ig (molares Verhältnis Fluoreszein: Ig 3:1); die Markierung isoliert gezüchteter Alpha-hämolytischer Streptokokken wird ebenfalls mit FITC

vorgenommen, Wachsmuth, E. D. (1970). Die Myokard-Gewebsschnitte sind tiefgefroren und mit Azeton fixiert. Das Kriterium dieser Nachweismethode nach Wachsmuth, E. D. (1970) ist die Lokalisation des Antigen im Gewebsschnitt an gleicher Stelle, an der die Bindung des Immunglobulin in vivo stattgefunden hat. Die üblichen Immunfluoreszenzmethoden, beruhend auf der Lokalistion des Antigen durch spezifische Immunglobuline, führen Wachsmuth, E. D. (1970) in Gewebsschnitten nicht zum Ziel, da diese Immunglobuline auch von kreuzreagierenden Gewebeteilen direkt gebunden werden. Daher muß das Antigen markiert und sein Bindungsort auf diese Weise direkt lokalisiert werden, Wachsmuth, E. D. (1970).

4.1.6. Mykoplasma pneumoniae

Mykoplasma-pneumoniae-Erreger (Synonyme: PPLO, EATON-Agens, pleuropneumonia like organism) haben unter den mikrobiellen Pneumonien im Schulalter eine besondere ätiologische Bedeutung, Foy, H. M. und Mitarb. (1966); Foy, H. M. und Alexander, E. R. (1969). Mykoplasma pneumoniae ist der häufigste Erreger (ca. 65 %) der sogenannten Primäratypischen Pneumonie, Müller-Wening, W. und Mitarb. (1977). Als spezifischer Nachweis für Mykoplasma-pneumoniae-Infektion gilt die serologische Untersuchung mit der Komplementbindungsreaktion, Müller-Wening, W. und Mitarb. (1977). Fluoreszenzserologisch lassen sich Mykoplasma-pneumoniae-spezifische IgM- und IgG-Antikörper nachweisen, Skaug, K. und Mitarb. (1976). Diese Autoren berichten über Auftreten, Entwicklung und Persistenz dieser spezifischen Serum-Antikörper. Sie gehen der Frage nach, ob das Vorhandensein von IgM-Antikörper in einer einzelnen Serum-Probe diagnostischen Hinweis auf eine gegenwärtige Mykoplasma-pneumoniae-Infektion gibt. In den ersten 3 bis 4 Wochen nach Ausbruch der Infektion finden Skaug, K. und Mitrab. (1976) einen weitgehend paralell verlaufenden Titeranstieg sowohl mittels der Komplementbindungsreaktion (KBR) als auch im IgM- und IgG-Fluoreszenzantikörper-Test. Selbst eine antibiotische Behandlung gleich nach Infektionsausbruch verhindert jenen Titeranstieg nicht, Skaug, K. und Mitarb. (1976).

Die spezifischen IgG-Antikörper verweilen nach Ausbruch der Mykoplasma-pneumoniae-Infektion länger im Serum als die IgM-Antikörper, Skaug, K. und Mitarb. (1976); Biberfeld, G. (1968 und 1971).
Bis zu 6 Monaten nach Krankheitsausbruch können nach Skaug, K. und Mitarb. (1976) spezifische IgM-Antikörper fluoreszenzserologisch identifiziert werden. Biberfeld, G. (1971) stellt bis zu 4 Jahren nach Infektionsausbruch einen positiven IgM Fluoreszenzantikörper-Test fest. Eine antibiotische Behandlung hat nach Skaug, K. und Mitarb. (1976) einen möglichen limitierenden Einfluß auf IgM-Persistenz. Skaug, K. und Mitarb. (1976) und Biberfeld, G. (1971) machen die Beobachtung, daß das IgM/IgG-Titerverhältnis in einem Bezug zum Alter des Patienten steht. Eine Reinfektion mit Mykoplasma pneumoniae erklärt möglicherweise dieses bei jugendlichen Patienten - unter 20 Jahren - höhere Antikörpertiterverhältnis, Skaug, K. und Mitarb. (1976). Ein negativer IgM-Fluoreszenzantikörper Test in einer einzelnen Serumprobe mit positiver KBR schließt daher besonders bei alten Patienten eine gegenwärtige Mykoplasma-pneumoniae-Infektion aus, Skaug, K. und Mitarb. (1976).Auch eine eventuelle antibiotische Behandlung beeinflußt nicht den Wert dieser Aussagen, Skaug, K. und Mitarb. (1976). Eine positive KBR und ein positiver Befund des IgM-FA-Tests in einer einzelnen Serumprobe läßt eine gegenwärtige Mykoplasma-pneumoniae-Infektion als sehr wahrscheinlich gelten; beweiskräftig ist dieser Befund jedoch insofern nicht, da die spezifischen IgM-Antikörper während einer früheren Mykoplasma-pneumoniae-Infektion entstanden sein könnten, Skaug, K. und Mitarb. (1976).
Verschiedene fluoreszenzserologische Nachweisverfahren von Mykoplasmen-Kolonien sind publiziert worden: Barile, M. F. und Del Giudice, R. A. (1972); Del Giudice, R. A. und Mitarb. (1967); Al-Aubaidi, J. M. und Fabricant, J. (1971); Lehmkuhl, H. D. und Frey, M. L. (1974); Lind, K. (1970); Rosendal, S. und Black, F. T. (1972); Stewart, S. M. (1967); Frey, M. C. und Mitarb. (1973); Stübner, G. (1976).

Bradbury, J. M. und Mitarb. (1976) beschreiben eine einfache, schnell durchzuführende und ergiebige, direkte und indirekte Immunfluoreszenzmethode: ein 6 mm Gummi-Stöpsel („rubber stopper") von 10 mm Durchmesser wird dazu benutzt, das antigenhaltige Untersuchungsmaterial direkt vom Agar auf Objektträger zu übertragen. Der Boden des Stöpsels wird leicht auf die ausgesuchten Kolonien gesetzt,vorsichtig angehoben und sofort auf Objektträger übertragen. Druckanwendung ist nicht erforderlich; von einer Stöpselprobe lassen sich durch leicht ansteigenden Druck 2 bis 3 Abdrücke anfertigen. Die auf diese Weise gewonnenen Abdrücke von Mykoplasmen-Kolonien werden mit der Flamme fixiert ohne den Antigengehalt zu zerstören. Als Fluorochrom benutzen Bradbury, J. M. und Mitarb. (1976) Fluoreszeinisothiozyanat (FITC). Die Autoren erhalten bei direkter und indirekter Immunfluoreszenztechnik leuchtende und spezifische Fluoreszenzbilder ohne unspezifische Reaktionen und ohne Kreuzreaktionen.
Ein Vergleich der Stöpsel-Transfer-Methode („rubber stopper transfer method") mit der Heißwasserfixation-Technik (Clarke, H. W. und Mitarb. (1961); Rosendal, S. und Black, F. T. (1972) und ferner ein Vergleich mit der Färbemethode von unfixierten Kolonien auf Agarblöcken (Rosendal, S. und Black, F. T. (1972) fällt nach Bradbury, J. M. und Mitarb. (1976) zugunsten der erstgenannten Methode aus. Nach Bradbury, J. M. und Mitarb. (1976) erweist sich das „rubber stopper transfer-Verfahren" als einfacher und schneller ausführbar und mit besseren Ergebnissen als die anderen genannten Methoden.Die Heißwasser-fixierten Kolonien fluoreszieren weniger spezifisch; Hintergrundfluoreszenz stellt bei der Agarblock-Technik ein großes Problem dar, Bradbury, J. M. und Mitarb. (1976). Dieselben Reagenzien in Verbindung mit der „rubber stopper transfer-Technik" angewandt, ergeben nach Bradbury, J. M. und Mitarb. (1976) weitaus bessere Resultate. Der direkten Anfärbbarkeit von Mykoplasmen sind auf Grund hoher Empfindlichkeit dieser Bakterien gegen chemische Einflüsse Grenzen gesetzt, und die Resultate der Giemsafärbung sind nicht immer eindeutig zu interpretieren, Stübner, G. (1976); die In-situ-Färbung nach

Dienes und Weinberger (zitiert bei Stübner, G. (1976)) mit Methylenblau und Azur II setzt die Anzüchtung auf Agar voraus. Auf der Suche nach geeigneten Direktfärberverfahren scheinen die Fluorochrome der Acridinreihe auf Grund ihrer physikochemischen Eigenschaften erfolgversprechend, Stübner, G. (1976). Stübner, G. (1976) führt mit den Acridinderivaten (Acridinorange, 9-Aminoacridinchlorid-1-hydrat) eine Vitalfluorochromierung von Mykoplasmen durch. Unter dem Plattenmikroskop werden auf Spezialagar gezüchtete Mykoplasmen-Kolonien mit einer ausgezogenen Glaskapillare vom Agar ausgestochen und auf einen Objektträger gebracht. In einem zweiten Ansatz werden kleine Agarblöcke (ca. 3 x 2 mm) mit den darauf befindlichen Mykoplasmen-Kolonien ausgeschnitten und mit der Kolonieseite auf den Objektträger angedrückt. Nach Aufbringen eines Tropfens 9-Aminoacridinchlorid-1-hydrat-Lösung wird mit einem Deckglas abgedeckt. Die Beachtung besonderer Färbezeiten ist nicht nötig, da die Mykoplasmen den Farbstoff sofort annehmen, Stübner, G. (1976). Bei Verwendung von Acridinorange und durch die Doppelfluorochromierung mit 9-Aminoacridinchlorid-1-hydrat und Acridinorange erzielt Stübner, G. (1976) auf bakteriell mischinfiziertem Material optisch einen besseren Kontrast zu den Bakterien als bei alleiniger 9-Aminoacridinchlorid-1-hydrat-Anfärbung. Hierbei erfolgt zuerst die Färbung des Bakterien-Mykoplasmen-Gemisches mit Acridinorangelösung 1:100, unmittelbar darauf oder auch nach kurzer Antrocknung wird ein Tropfen 9-Aminoacridinchlorid-1-hydrat 1:100 zugegeben, Stübner, G. (1976). Die Untersuchung mit Dunkelfeldkondensor (num. Ap. 1,4) und Ölimmersion kann unmittelbar nach Anfertigung der Präparate erfolgen, Stübner, G. (1976).
Die Mykoplasmen lassen sich auf diese Weise in Abhängigkeit von Fluorochrom-Konzentration und dem pH-Wert der verwandten Lösungen anfärben, Stübner, G. (1976). Die Mykoplasmen werden als kreisrunde, homogen hellgelb -hellgrün fluoreszierende Scheiben unterschiedlicher Größe und Helligkeit sichtbar, sowohl bei Verwendung von Acridinorange als auch von 9-Aminoacridinchlorid-1-hydrat, Stübner, G. (1976). Deutliche Unterscheidung von unspezifischen Beimengungen im Untersuchungsmaterial sowie von grampositiven und gramnegativen Bakterien ist auf Grund der verschiedenen An-

färbbarkeit und durch die oben erwähnte Doppelfärbung gut möglich, Stübner, G. (1976). Diese Direktfluorochromierung erscheint nach Stübner, G. (1976) wegen der einfachen Durchführung der Färbung, der kurzen Färbezeit und der charakteristischen Anfärbung und Formdarstellung der Mykoplasmen als Suchmehtode geeignet.

4.1.7. Hämophilus influenzae

Typ b-Stämme von H. influenzae sind die Erreger der Hämophilus-Meningitis und von anderen akut-eitrigen Infektionen, Catlin, B. W. (1970).
Die Typeneinteilung von H. influenzae erfolgt mit Hilfe der Kapselquellungsreaktion, Alexander, H. E. (1965); durch den Agglutinations- oder Präzipitationstest, Pittman, M. (1931); Omland, T. (1963) und mit Hilfe des Immunfluoreszenzverfahrens, Catlin, B. W. (1970). Die Immunfluoreszenzmikroskopie ist eine wertvolle Hilfe, den Erregertyp in Fällen von Hämophilus-Meningitis zu bestimmen, Pape, R. H. und Mitarb. (1961); Fox, H. A. und Mitarb. (1969). Sell S.H.W. und Mitarb. (1963) zeigen, daß die Immunfluoreszenz-Methode empfindlichere Typennachweise liefert als die Objektträger-Agglutination.
Catlin, B. W. (1970) untersucht den Liquor eines an Meningitis erkrankten Kindes und findet unter Anwendung des Immunfluoreszenzverfahrens und der kulturellen Züchtung eine heterogene H. influenzae-Population. Die meisten der Bakterien besitzen Typ b-Kapseln und erscheinen als irridierende und sogenannte smooth-Kolonien, Pittman, M. (1931). Einigen jedoch fehlt die typische Kapsel, und diese Bakterien bilden nicht-irridierende, sogenannte rough-Kolonien, Catlin, B. W. (1970). Obschon diese Bakterienvariante durch den Kapselquellungstest nicht einzuordnen ist, bildet sie Typ b-Antigen, das als diskrete Erhabenheit in Erscheinung tritt, und als starke Fluoreszenz imponiert, Catlin, B. W. (1970). Catlin, B. W. (1970) beweist die Identität von Typ b- Antigen und den im Fluoreszenztest stark fluoreszierenden Erhabenheiten im Inhibitionstest und im Gel-Diffusionstest (Ouchterlony).

Nur mit Hilfe der Immunfluoreszenz kann Catlin, B. W. (1970) nicht bekapselte Hämophilus-Varianten typisieren und einen Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Zell- und Koloniemorphologie und genetischen Differenzen von bekapselten und unbekapselten Bakterien ableiten. Catlin, B. W. (1970) stellt eine kontinuierliche Instabilität der Bekapselung als besonderes Merkmal von H. influenzae -Typ b fest. Diese genetische Variationshäufigkeit läßt vermuten, daß auch noch bei anderen H. influenzae-Varianten, die von Sanders,D.Y.und Garbee, H. W. (1969) und anderen Forschern wie: Alexander, H. E. (1965); Pittman, M. (1931); Chandler, C. A. und Mitarb. (1939) als nicht typisierbar eingestuft wurden, durch das Immunfluoreszenzverfahren eine Typenzuordnung bewiesen werden kann, Catlin, B. W. (1970).

4.1.8. Bakterielle Meningitis: Neisseria meningitidis, Diplococcus pneumoniae und Hämophilus influenzae

Als Erreger der bakteriellen Meningitis kommen H. influenzae, Pneumokokken und Neisseria meningitidis in Frage, Fox, H. A. und Mitarb. (1969). Die tuberkulöse Meningitis sei ausgeklammert. Die Ernsthaftigkeit und der oft fulminante Krankheitsverlauf verlangen eine rasche und spezifische Erregerdiagnostik. Schon beim leisesten Verdacht einer Meningitis muß die Lumbalpunktion durchgeführt werden, Smith, D. H. und Mitarb. (1973).
Fox, H. A. und Mitarb. (1969) untersuchen Liquorproben von akuten bakteriellen Meningitisfällen und beschreiben und vergleichen den diagnostischen Wert folgender Methoden:
Gram-Färbung, kulturelle Züchtung und Immunfluoreszenzverfahren. Ähnliche Untersuchungen wurden von Page, R. H. und Mitarb. (1961) und Grossman, M. und Mitarb. (1964) bereits früher durchgeführt, und zwar mit unterschiedlichen Ergebnissen. So erweist sich in der Studie von Grossman, M. und Mitarb. (1964) die Immunfluoreszenztechnik bei der bakteriellen Meningitisdiagnose als weniger empfindlich als die kulturelle Züchtung, allerdings gleichwertig mit der Gram-Methode. Auf technische Einzelheiten der methodischen Anordnung sei nicht eingegangen.

Fox, H. A. und Mitarb. (1969) zeigen, daß die Immunfluoreszenz-, wie auch die konventionelle Methode, eine genaue Erregerdiagnose der bakteriellen Meningitis liefern. Der Vorteil des Immunfluoreszenzverfahrens liegt in der Schnelligkeit, mit der die Befunde erhoben werden können: innerhalb von 1 Stunde nach Eintreffen der Liquorprobe kann nach Fox, H. A. und Mitarb. (1969) bereits der spezifische serologische Erregernachweis erhoben werden. Abgetötete oder antibiotisch beeinflußte Erreger können nachgewiesen werden; ferner gelingt nach Fox, H. A. und Mitarb. (1969) der Erregernachweis auch in erregerarmen Liquorproben. Die Autoren erhalten bei ihren fluoreszenzserologischen Untersuchungen keine falsch positiven Befunde im Liquormaterial von Patienten mit viraler Meningitis, oder mit Fieber unbekannter Ursache, Fox, H. A. und Mitarb. (1969). Allgemein läßt sich sagen, daß die Immunfluoreszenztechnik in Verbindung mit konventionellen Nachweismethoden eine wertvolle zusätzliche Diagnostikhilfe ist, besonders in Laboratorien, die viele Liquorproben zu untersuchen haben, Fox, H. A. und Mitarb. (1969).

4.1.9. Die indirekte Immunfluoreszenz in der Serodiagnostik der chronischen Pyelonephritis

Zur Objektivierung der Diagnose einer Pyelonephritis ist der Nachweis humoraler Antikörper gegen den Erreger eine wertvolle Stütze, da sie bei Infektionen, die in den unteren Harnwegen lokalisiert sind, nicht, oder meist nur in geringerer Qualität nachzuweisen sind, Schmidt, H. und Mitarb. (1975).
Bei der akuten Pyelonephritis führen die Widal-Reaktion sowie die indirekte Hämagglutinationsreaktion zum eindeutigen diagnostischen Ergebnis, Schmidt, H. und Mitarb. (1975). In der Diagnostik der chronischen Pyelonephritis bringt dagegen der Einsatz der Widal-Reaktion und der indirekten Hämagglutinationstechnik meist unbefriedigende Ergebnisse, Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Nur akute Rezidive chronischer Pyelonephritiden sind mit diesen Seroreaktionen objektivierbar, Siede, W. und Luz, K. (1941); Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Nach Schmidt, H. und Mitarb. (1975) gelang es nur wenigen Autoren, auch chronische Pyelonephritiden mit Hilfe der indirekten Hämagglutinationstechnik serologisch deutlich zu erfassen.

Die mit der Widal-Reaktion und der indirekten Hämagglutination nachweisbaren Serumantikörper gehören vorwiegend der IgM-Klasse an, Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Im Verlauf einer akuten Pyelonephritis werden vorwiegend IgM-Antikörper gebildet, die mit den genannten beiden Techniken nachgewiesen werden können, Hanson, L. A. und Mitarb. (1969); Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Bei der chronischen Pyelonephritis jedoch stellen IgG-Antikörper das Hauptkontingent gegen den Erreger gerichteter humoraler Antikörper dar, Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Ihr Nachweis muß daher mit Widal- und indirekter Hämagglutinationsreaktion zu schlechten Ergebnissen führen, Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Nach Hanson, L. A.(1973) bilden auch Patienten mit rezidivierenden Harnwegsinfekten mit zunehmender Häufigkeit der Krankheitsepisoden vermehrt IgG-Antikörper. Die weiter zuungunsten der IgM-Antikörper verschobenen Relationen lassen auch den serologischen Nachweis eines akuten Schubs einer chronischen Pyelonephritis mit Hilfe der indirekten Hämagglutination unsicher erscheinen, Schmidt, H. und Mitarb. (1975). Schmidt, H. und Mitarb. (1975) berichten über einen indirekten Immunfluoreszenztest, der für die Serodiagnostik der Pyelonephritis eine wesentliche Bereicherung darstellt. Mit diesem Test werden vor allem die gegen das O-Antigen des homologen Erregers gerichteten Antikörper von IgG-Spezifität nachgewiesen. Es handelt sich um bestimmte Escherichia coli-O-Gruppen, die nach Schmidt, H. und Mitarb. (1975) eine repräsentative Auswahl von bei Harnwegsinfektionen häufig vorkommende O-Gruppe darstellen.
Beim Erwachsenen mit chronischer Pyelonephritis liegt nach Schmidt, H. und Mitarb. (1975) der mittels Immunfluoreszenztechnik ermittelte Antikörpertiter in 63,3 % über der bei Gesunden mit gleicher Technik erhaltenen oberen Normgrenze. Bei der Widal- und der indirekten Hämagglutinationsreaktion betragen nach Schmidt, H. und Mitarb. (1975) die entsprechenden Werte 16,5 % und 12,5 %. Diese Ergebnisse beweisen die eindeutige Überlegenheit der Immunfluoreszenztechnik in der serologischen Diagnostik der chronischen Pyelonephritis gegenüber der Widal- und der indirekten Hämagglutinationsreaktion, Schmidt, H. und Mitarb. (1975).
In den vergangenen 10 Jahren wurden von den verschiedensten Ar-

beitsgruppen mit dem Ureterenkatheterismus und dem Blasenauswaschtest nach Fairley, K. F. und Mitarb. (1967) Harnwegsinfekte lokalisiert, Scherf, H. und Mitarb. (1978). Unabhängig von den speziellen Fragestellungen der einzelnen Autoren kann man nach Scherf, H. und Mitarb. (1978) den Untersuchungen übereinstimmend entnehmen, daß das klinische Bild der Pyelonephritis oder Cystitis keine zuverlässige Aussage über den Infektionsort zuläßt. Supravesikale Bakteriurien wurden bei Patienten mit cystitischen Beschwerden und asymptomatischen Bakteriurien diagnostiziert, Scherf, H. und Mitarb. (1978). Sie waren nicht mit urographischen Befunden und der Höhe der Antikörpertiter im Serum korrelierbar, Scherf, H. und Mitarb. (1978). Da die direkten Methoden für den Routinegebrauch zu aufwendig sind, ist es einleuchtend, daß nach neuen, einfacheren indirekten Methoden zur Lokalisation von Harnwegsinfekten gesucht wird, Scherf, H. und Mitarb. (1978). Von Jones, R. J. und Mitarb. (1974) wurde der Versuch unternommen, die empirischen, auf klinischen Kriterien beruhenden Grundlagen des Immunfluoreszenztestes zu erhärten.Die Autoren geben als Bewertungskriterium für eine supravesikale Bakteriurie über 100 Keime /ml in wenigstens drei der entnommenen supravesikalen Harnportionen an und beziehen sich damit auf Boutros, P. und Mitarb. (1972). Diese Keimzahl halten Scherf, H. und Mitarb. (1978) für zu niedrig, übereinstimmend mit anderen Autoren: nach Smeets, F. und Gower, P. E. (1973) kann erst bei Werten von 1000 Keimen /ml und mehr im nach der Spülung aufgefangenen Harn von „renaler Bakteriurie" gesprochen werden. Fairley, K. F. und Mitarb. (1973) halten 100 Keime in einer supravesikalen Harnportion für einen Wert, der noch als vesikale Bakteriurie zu interpretieren ist. Auch Scherf, H. und Mitarb. (1977) sind auf Grund mehrjähriger Erfahrung mit dem Blasenauswaschtest sowie vergleichender Untersuchungen mit dem beiderseitigen Ureterenkatheterismus zu diesem Standpunkt gelangt.

Die vergleichenden Untersuchungen von Scherf, H. und Mitarb. (1977) der Antikörperbestimmung im Serum mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik bei Kindern mit rekurrierenden Harnwegsinfekten mit dem Blasenauswaschtest nach Fairley, K. F. und Mitarb. (1967) zeigen eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse beider

Methoden. Der diagnostische Wert einer Antikörperbestimmung im Serum gegen die homologen Erreger eines Harnwegsinfektes mittels des indirekten Immunfluoreszenztestes liegt nach Scherf, H. und Mitarb. (1977) darin, daß Titerwerte von 1:40 und darunter sicher gegen die Beteiligung des oberen Harntraktes am Infektgeschehen sprechen. Titerwerte ab 1:80 können eine supravesikale Bakteriurie anzeigen oder aber auch Ausdruck eines besonders stimulierten Immunsystems sein, Scherf, H. und Mitarb. (1977).
Durch weitere Untersuchungen zum Nachweis antikörperbeladener Bakterien im Urinsediment bei kindlichen Harnwegsinfektionen kommen Scherf, H. (1978) zu der Meinung, daß der Immunfluoreszenztest bei Mädchen mit rekurrierenden Harnwegsinfekten nicht zur Infektionslokalisation geeignet ist.
Scherf, H. und Mitarb. (1978) führen den Immunfluoreszenztest auf folgende Weise aus: 1 ml Urin wird bei 12 000 U/min für 2 min zentrifugiert, das Sediment zweimal mit Phosphatpuffer (pH 7,3) gewaschen, mit 0,2 ml Antihumanglobulin von der Ziege (BBL) bzw. monospezifischen Antiseren von Kaninchen, Antihuman IgG, - IgA und -IgM, (Behringwerke), in einer Verdünnung von 1:5 für 30 min bei 37° C inkubiert, wiederum zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Vom Sediment werden auf mit 10 Feldern markierten Objektträgern (Hölzel) Ausstriche gemacht, und zwar auf je zwei Felder derselbe Ansatz. Nach Lufttrocknung wird im UV-Durchlichtmikroskop (Zeiss) auf Fluoreszenz geprüft.
Bei allen für den Harntrakt pathogenen Keimen können die Autoren Antikörper auf der Bakterienoberfläche nachweisen. E. coli steht beim untersuchten Patientengut ganz im Vordergrund. Positive Immunfluoreszenz erhalten die Autoren auch bei Proteus mirabilis, Citrobacter, Klebsiellen, Pseudomonas aeruginosa und hämolysierenden Streotokokken der serologischen Gruppe B. Bei den Enterokokken gelingt der Nachweis einer Antikörperbeladung auffallend seltener; diese Keime fluoreszieren auch häufig nur schwach, Scherf, H. und Mitarb. (1978). Bei den supravesikalen und vesikalen Bakteriurien gelingt der kombinierte Nachweis von IgG und IgA am häufigsten. Bei den supravesikalen Bakterurien folgt die Beladung mit Antikörpern von IgG-, IgA- und IgM-Spezifität in 30,% alleinige IgA und IgG-Beldaung in nur wenigen Fällen. Bei den vesikalen Bakteriurien finden Scherf, H. und

Mitarb. (1978) IgG, IgA und IgM kombiniert in 22% der Urinsedimente. Auffallend ist nach Scherf, H. und Mitarb. (1978), daß 31 % der kindlichen Urinsedimente lediglich eine IgA-Beladung zeigen im Gegensatz zum niederen Prozentsatz bei supravesikaler Bakteriurie.
Weibliche Patienten mit rekurrierenden Harnwegsinfekten stellen eine besonders wichtige Gruppe innerhalb der Patienten mit Harnwegsinfekten dar. Die Möglichkeit, den Ort des Infektgeschehens zu bestimmen, wäre nach Scherf, H. und Mitrab. (1978) für diese Gruppe von besonderer Bedeutung in bezug auf Prognose und mögliche therapeutische Konsequenzen. Die Untersuchungsergebnisse von Scherf, H. und Mitarb. (1978) machen jedoch deutlich, daß der Nachweis antikörperbeladener Bakterien bei einem kindlichen weiblichen Patientengut mit rekurrierenden Harnwegsinfektionen nicht zur Lokalisationsdiagnose geeignet ist, da 59 % der von Scherf, H. und Mitarb. (1978) untersuchten Blasenbakteriurien einen positiven Immunfluoreszenztest ergeben.
Erwähnt sei noch das fluoreszenzoptische Verfahren mit dem Fluorochrom 4',6 - Diamidino -2- phenylindol (DAPI), Großgebauer, K. und Mitarb. (1976). Aus den orientierenden Untersuchungen von Großgebauer, K. und Mitarb. (1976) über die Anwendung von DAPI zur fluoreszenzoptischen Darstellung von Bakterien verschiedener Art geht hervor, daß sich auch bei der Suche nach chronischen Pyelonephritiden die Anfärbung des Urinsedimentes mit DAPI bewährt hat. Sie führt nach Großgebauer, K. und Mitarb. (1976) rascher zur Darstellung von phagozytierten Keimen in Leukozyten als die gebräuchlichen Färbeverfahren. Als besondere Vorteile von DAPI erwähnen Großgebauer, K. und Mitarb. (1976) die Stabilität (kein Abblassen der gefärbten Präparate innerhalb von Tagen), die Anwendung in geringsten Quantitäten, die rasche Anfärbbarkeit und die einfache Handhabung.

4.2. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Virologie

Die Immunfluoreszenz findet wie in der bakteriologischen, so auch in der virologischen Forschung zahlreiche Anwendung, Goetz, O. und Peller, P. (1970); Raue, W. (1971); Klietmann, W. (1976); Fuchs, G.H.P. (1967); Desselberger, U. (1975); Naumann, G. und Wildführ, G. (1965); Wick, G. und Mitarb. (1976). Sie hat sich vielfach als Routinemethode etabliert, dies gilt z. B. für die Diagnose von Tollwut, Röteln und Cytomegalievirusinfektionen, Wick, G. und Mitarb. (1976).

4.2.1. Varizella-Zoster-Virus (VZV)

Vom Varizella-Zoster-Virus (VZV) ist bekannt, daß es zwei Krankheitsbilder hervorrufen kann: die Erstinfektion führt zu Varizellen, bei einer massiven Reinfektion oder einer Reaktivierung des latent in den Ganglienzellen der Rückenmark-Hörner ruhenden VZV kann eine Zweiterkrankung in Form eines Herpes Zoster folgen, Balg, G. (1977). VZV-Infektionen sind bei Leukämie-Patienten besonders gefürchtet, sowohl als Primärinfektion wie auch in Form des Herpes Zoster, der zum Zoster generalisatus exazerbieren kann, Luthard, Th. und Wehinger, H. (1976).
Windpocken - für das Kind in der Regel harmlos - bringen auch in anderer Hinsicht ein hohes Risiko mit: in der Schwangerschaft bedeuten sie für den Embryo eine unterschiedliche Schädigung, Luthardt, Th. (1977). Der Verdacht, daß die pränatale VZV-Infektion zu einem kongenitalen Varizellen-Syndrom führt, wurde 1974 von Scrabstein, J. C. und Mitarb. (1974) zum ersten Mal bestätigt. Balg, G. (1977) erörtert die Pathogenese einer pränatalen VZV-Infektion innerhalb definierter Schwangerschaftsabschnitte und versucht, die davon ableitbare unterschiedliche Prognose des Kindes zu begründen.
Windpocken in der Schwangerschaft sind jedoch selten: auf 2000 Schwangerschaften dürfte ein Fall von Windpocken kommen, Luthardt, Th. (1977); allerdings ist manchen Frauen nicht bekannt, ob sie

diese Infektionskrankheit einmal durchgemacht haben oder nicht, Luthardt, Th. (1977). Selbst bei jungen Menschen ist die Anamnese erstaunlich häufig unklar, oder sie wird sogar falsch negativ angegeben, wie dies aus Untersuchungen von Luthardt, Th. (1977) hervorgeht. Mangels Wissen um die Varizellen- Anamnese kann aber in bestimmten Situationen, etwa bei exponierten Graviden oder bei besonders gefährdeten Patienten (Leukämie-Patienten) der Einsatz zuverlässiger und genauer Methoden erforderlich sein, um den Varizellenantikörpergehalt zu klären, Luthardt, Th. (1977). Die VZV-KBR ist brauchbar - den Untersuchungen von Balg, G. (1977) liegen nur die Ergebnisse dieser Methode zugrunde-, ihre Empfindlichkeit ist jedoch selbst bei sorgfältigster Durchführung gerade in Grenzsituationen nicht ausreichend, Luthardt, Th. und Wehinger, H. (1976). Daher wurden Immunfluoreszenzmethoden entwickelt, Luthardt, Th. (1977); Williams, V. und Mitarb. (1974); Gershon, A. A. und Mitarb. (1976); Gershon, A. A. und Krugman, S. (1975), deren Anwendung bei negativem KBR-Befund in jedem Fall indiziert ist, Luthardt, Th. (1977); Luthardt, Th. und Wehinger, H. (1976). Der Immunfluoreszenztest stellt spezifische Einschlußkörper dar und besitzt neben der besonders hohen Spezifität große Empfindlichkeit, Luthardt, Th. und Wehinger, H. (1976). Luthardt, Th. (1977) hält es für erforderlich, daß vor Applikation des Zoster-Immunglobulins der Antikörperstatus mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik, der empfindlichsten verfügbaren Nachweismethode kontrolliert wird.
Williams, V. und Mitarb. (1974) entwickelten eine Immunfluoreszenzmethode zur Darstellung von Antikörpern, die gegen Membran- oder Oberflächenantigene von VZV-infizierten Zellen gerichtet sind (Varicella-Zoster-fluorescent antibody to membrane antigen= VZ-FAMA). Die Autoren beschreiben folgende Testdurchführung:
Zur Herstellung von infizierten Zellen werden menschliche embryonale Lungenfibroblasten verwandt, Der Stamm NyU-17 als Monolayer-Deckglaskultur wird mit modifiziertem Eagles'-Nährboden, Kissling, R. E. und Reese, D. R. (1963) - zur Fortpflanzung gebracht, und zwar mit 400 I. E. Penicillin /ml, 200 mg Streptomycin/ml und 10 %igem heißinaktiviertem fetalem Kälberserum.

Zur Bestanderhaltung dient ein Nährboden mit 2 %igem Kälberserum. Die vom VZ-Virusstamm„Ellen" infizierten Fibrolasten werden auf frische embryonale humane Lungenfibrolasten-Kulturen im Einschichtverfahren aufgetragen. Die Kulturen werden nach der Inokulation für ca. 48 Stunden unterhalten bis in 90 % der Einschichtplatten ein zytopathogener Effekt (CPE) beobachtet wird.

Williams, V. und Mitarb. (1974) verfahren anschließend nach folgender Immunfluoreszenztechnik: die Einzellagen werden in eine 0,01 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4 gebracht und bei 1.000 g 5 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und kann verworfen werden, und aus den kugelförmigen Zellen wird mit PBS als Verdünnungsmittel erneut eine Suspension hergestellt und auf ca. 10^5 Zellen /ml eingestellt. Die auf diese Weise erhaltene Zellsuspension teilen Williams, V. und Mitarb. (1974) ohne Rest in gleiche Teile auf, indem sie jeweils 0,025 ml der Suspension mit der gleichen Menge des verdünnten Testserums auf Mikrotiter-Apparaturen inkubieren (U. Plate, Cooke Engineering, Alexandria, Va). Nach Ablauf von 30 min in der feuchten Kammer bei 25° C werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen; - zwischen den einzelnen Waschvorgängen werden die Mikrotiter-Apparaturen jeweils bei 1.000 g für 10 min zentrifugiert (International PR 2 Zentrifuge). Der Überstand wird jeweils verworfen.
Williams, V. und Mitarb. (1974) verwenden verdünnte Fluoreszeinmarkierte Konjugate (FITC-Konjugate; Antihumanglobulinfraktion von der Ziege; Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md.). 0,025 ml dieser Antiserumverdünnung werden mit dem gewaschenen Zellsediment 30 min lang bei 25° C inkubiert. Es folgt dreimaliges Waschen mit PBS. Ein Tropfen einer 1:9 verdünnten PBS- und Glycerin-Lösung wird mit ca. 10 lamda der wiedererhaltenen Zellsuspension auf einen Objektträger aufgebracht. Die Zellen werden mit einem Deckglas abgedeckt und die Kanten mit Nagellack abgedichtet. Die Objektträger werden unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Phasenfluoreszenzkondensor von Leitz beurteilt. Williams, V. und Mitarb. (1974) verwenden einen

UG- 1 Erregerfilter und einen 2 S- Sperrfilter.
In jeder Testreihe werden die mit Code-Nummern versehenen Präparate - einschließlich positive und negative Kontrollseren in bekannter Verdünnung - von zwei unabhängigen Beobachtern beurteilt und auf Membranfluoreszenz hin untersucht. Die Untersuchungsergebnisse werden mit einander verglichen bevor die Bedeutung der Code-Nummern bekanntgegeben werden.
Williams, V. und Mitarb. (1974) führen Vergleichsuntersuchungen durch mit Hilfe der KBR. Die Konjugate werden nach Williams, V. und Mitarb. (1974) folgendermaßen standardisiert: Absorption der fluoreszeinkonjugierten Anti-Humanglobulinseren bei 4° C mit Leberpulver (Baltimore Biological Laboratories); Lagerung zu gleichen Teilen bei -20° C. Ferner werden in Verdünnungsreihen Schachbrettitrationen von Konjugat und Patientensera durchgeführt. Unter diesen Titrationen wird eine Konjugatverdünnung ermittelt, die übereinstimmend positive Reaktionen anzeigt mit Seren von erwachsenen Patienten, die in ihrer Kindheit an Windpocken erkrankt waren; dieselbe Konjugatverdünnung zeigt durchweg eine negative Reaktion mit Seren von suszeptiblen (= seronegativen) Patienten. Diese Patienten acquirierten alle hinterher Windpocken. Die positiven Testbefunde stellen sich dar als helle Fluoreszenzringe um die Oberfläche der mit VZ-Virus infizierten Zellen. Williams, V. und Mitarb. (1974) beobachten keine Autofluoreszenz der infizierten oder nicht infizierten Zellen und keine Kreuzreaktion mit anderen nahen verwandten Viren der Herpesgruppe. Die Überlegenheit der Immunfluoreszenzmethode gegenüber der KBR wird von maßgeblichen Autoren bestätigt: Balg, G. (1977); Luthardt, Th. (1977); Gershon, A. A. und Mitarb. (1976); Gershon, A. A. und Krugman, S. (1975); Williams, V. und Mitarb. (1974). Luthardt, Th. und Wehinger, H. (1976) beispielsweise erhalten folgende Befunde: von 43 in der KBR seronegativen Erwachsenen (das sind 13 % der untersuchten Seren) werden 30 in der Immunfluoreszenz einwandfrei positiv.
Das von Williams, V. und Mitarb. (1974) oben beschriebene Verfahren, immunserologisch Membranantikörper an VZV-infizierten

Zellen darzustellen, bietet die Möglichkeit, durch Verwendung von Mikrotiterapparaturen mit einer kleinen Serummenge eine große Anzahl von Proben gleichzeitig und ohne große Zeit- und Materialaufwand zu testen, Williams, V. und Mitarb. (1974). Außerdem wird das Testverfahren dadurch abgekürzt, daß Williams, V. und Mitarb. (1974) einen Kondensortyp verwenden, der die Anwendung von Öl nicht erforderlich macht. Falsch negative Befunde, die Williams, V. und Mitarb. (1974) bei der Untersuchung von unverdünnten Patientenseren beschreiben, lassen sich reduzieren oder eliminieren durch gleichzeitige Serumverdünnung im Verhältnis von 1:2, 1:4 und 1:8, Williams, V. und Mitarb. (1974).
Die Leistungsfähigkeit des Immunfluoreszenztests wird dadurch erweitert, daß verschiedene Immunglobulintypen differenziert werden können, Luthardt, Th. und W$_e$hinger, H. (1976). Über die humoralen Vorgänge bei einer VZV-Infektion sei auf die Arbeiten von Balg, G. (1977); Luthardt, Th. und Wehinger, H. (1976); Brunell, P. A. und Mitarb. (1969); Gershon, A. A. und Mitarb. (1976) verwiesen.
Die immunfluoreszenzserologischen Untersuchungen von Balg, G. (1977) dienen dazu, einerseits die Diagnose einer VZV-Infektion zu sichern, andererseits kann die humorale Immunreaktion von Mutter und Kind geprüft werden. Die Aspekte des zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossenen immunlogischen Reifungsprozesses des Kindes werden diskutiert, die die unterschiedliche Prognose des Kindes bei pränataler VZV-Infektion verständlich machen.

4.2.2. Cytomegalie-Virus

Die Cytomegalie (Synonyme: Speicheldrüsenviruskrankheit - salivary gland virus disease, zytomegale Einschlußkörperchenkrankheit-cytomegalic inclussion body disease - CID) hat vor allem als prä- und postnatale Infektion klinische Bedeutung, Stäubli, M. und Mitarb. (1976). Darüber hinaus finden sich im späteren Leben zahlreiche Situationen, in denen das Risiko einer Cytomegalievirus - (CMV-) Infektion erhöht ist: Schwangerschaft, Blut-

transfusionen, Organtransplantationen, krankheits- und therapiebedingte Immunsupression bei Malignompatienten, Stäubli, M. und Mitarb. (1976), Kreel, J. und Mitarb. (1960); Krech, U. und Jung, M. (1973), Oehme, J. (1973); Jäger, R. und Mitarb. (1975); Krech, U. und Jung, M. (1971); Farber, S. und Wolbach, S. B. (1932); Potter, E. (1957); Symmers, W.S.C. (1960) Wong, Ting-Wa und Warner, N. E. (1962); Yeager, A. S. (1974); Luthardt, Th. (1971); Stoll, H. U. (1974); Fine, R. N. und Mitarb. (1970); Balakrishnan, S. L. und Mitarb. (1969); Rifkind, D. und Mitarb. (1964); Klemola, E. und Kaariainen, L. (1965); Weller, Th. und Hanshaw, J. B. (1962); Hamburger, J. und Mitarb. (1965), Haas, R. und Mitarb. (1972). Nach Luthardt, Th. (1977) werden besonders häufig junge Frauen in ihrer ersten Schwangerschaft betroffen. 3 % aller Graviden scheiden das Virus aus, wesentlich mehr nach Luthardt, Th. (1977) als gleichaltrige Nicht-Gravide. In den Untersuchungen von Haas, R. und Mitarb. (1972) im Rahmen des Schwerpunktprogramms der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Schwangerschaftsverlauf und Kindesentwicklung" ergibt sich jedoch kein sicherer Anhalt dafür, daß sich der Faktor Schwangerschaft in einer Erhöhung des Anteils CMV-seropositiver Reagenten gegenüber Männern und Nichtschwangeren dokumentiert. Haas, R. und Mitarb. (1972) sowie Krech, U. und Jung, M. (1971) beschreiben verschiedene Faktoren, von denen die Durchseuchung mit CMV abhängt: beispielsweise Alter, sozioökonomische Situation, örtliche Gegebenheiten. Auf Einzelheiten der umfangreichen Literatur der letzten Jahre sei nicht näher eingegangen.

Von Bedeutung im Rahmen der Pädiatrie ist die Tatsache, daß 1 % aller Neugeborenen das CMV ausscheiden, Falke, D. (1977); Luthardt, Th. (1977). 5 bis 15 % dieser Neugeborenen werden klinisch krank oder von bleibenden Schäden befallen, Luthardt, Th. (1977); das bedeutet, daß nach Luthardt, Th. (1977) ca. 600 Neugeborene in der BRD jährlich durch Cytomegalie geschädigt werden. Man rechnet heute damit, daß durch intrauterine CMV-Infektion hervorgerufene Defekte doppelt so häufig vorkommen wie Defektbildungen nach intrauterinen Rötelinfektionen, Desselberger, U. (1975).

In diesem Zusammenhang verweisen Osterwalder, R. und Mitarb. (1973) und Stopfkuchen, H. und Mitarb. (1976) auf den möglichen Zusammenhang von Guillain-Barré-Syndrom und Cytomegalievirus, bzw. berichten zusätzlich Stopfkuchen, H. und Mitarb. (1976) über die interessante Möglichkeit einer Cytomegalieinfektion als Ursache einer Polyradiculoneuritis im Kindesalter. Besonders häufig findet die CMV-Infektion während oder kurz nach der Geburt statt, sie betrifft in der BRD ca. 20 % aller Kinder, Luthardt, Th. (1977). Im späteren Leben ist in speziellen Situationen mit iatrogenen CMV-Infektionen zu rechnen, Luthardt, Th. (1977); wichtigste Infektionsquelle ist die Bluttransfusion, Luthardt, Th. (1977); Yeager, A. S. (1974); Jäger, R. und Mitarb. (1975), denn ca. 60 % der Spender sind seropositiv und damit mögliche Virusüberträger, Luthardt, Th. (1977 und 1971). Offensichtlich infizieren sich Kinder in diesem Alter besonders leicht, außerdem ist die Bluttransfusion in dieser Entwicklungsphase relativ häufig und die empfangene Blutmenge besonders groß, Luthardt, Th. (1976). Bei Transplantatempfängern ist das Infektionsrisiko nach Luthardt, Th. (1977) noch größer, da alle gefährlichen Faktoren zusammenkommen: massive Immunsupression, Fremdblut und Fremdorgan, Stäubli, M. und Mitarb. (1976), Fine, R. N. und Mitarb. (1970). Dies führt zu einer bis 90 % reichenden Infektionsrate, Luthardt, Th. (1977).

SCHWANGERSCHAFT:	3 % Virurie, 1 % Übertragung auf Frucht
GEBURT UND ERSTE LEBENSWOCHEN:	Bis zu 20 % infizerte Kinder, Zervixsekret - Muttermilch-Pflegekontakte.
HEIMKINDER:	Nahezu 100 % Durchseuchung
BLUTTRANSFUSIONEN:	Jeder seropositive Spender kann übertragen. Massivtransfusionen.
MALIGNOMPATIENTEN:	Krankheits- und therapiebedingte Immunsupression
TRANSPLANTATEMPFÄNGER:	90 % CMV-Infektionen, Immunsupression-Fremdblut - Fremdorgan.

Tabl. 2: Risikosituationen hinsichtlich Erwerb von CMV-Infektionen. nach Luthardt, Th. (1977).

Aus den dargestellten Zusammenhängen geht hervor, daß die Cytomegalie die häufigste Infektion im Neugeborenen- und Säuglingsalter ist, Luthardt, Th. (1976).
Eine Frühdiagnose dieser Krankheit ist wichtig. Anlaß für eine Untersuchung kann sein, u. a.: Ikterus, Hepatosplenomegalie, Hepatitis (38 % der Fälle, Luthardt, Th. (1976)) oder zerebrale Schäden (15 % der Fälle, Luthardt, Th. (1976)); ferner Symptome einer rezidivierenden Pneumonie, Bronchitis oder ein pertussisähnliches Syndrom (8 % der Fälle nach Luthardt, Th. (1976)). Da im Blutbild sowohl der Keuchhusten wie auch die Cytomegalie mit erheblicher Leukozytose einhergehen, fordert Luthardt, Th. (1976), daß jeder Säugling mit Pertussisverdacht auf CMV-Infektion untersucht werden soll.
Die Tabelle 3 faßt die grundsätzliche Differentialdiagnose der Cytomegalie zusammen.

Ungeklärter M. hämolyticus neonatorum	Heptato-, Splenomegalie	
Ungeklärtes septisches Bild	Akute hämolytische Situation	Infektiöse Mononukleose
Heptato-, Splenomegalie	"Idiopathische" Thrombozytopenie	Unklare septische Fieberschübe
Hepatitis	Rezidivierende Luftwegsinfektionen	Lymphadenopathien
allengangsatresie	Pertussoider Husten	
Thrombozytopenie	Hartnäckige Dyspepsien	"Idiopathische" Thrombozytopenie
Vorgeburtliche zerebrale Schädigung	Lymphadenopathien	
Differentialdiagnose der Cytomegalie beim Neugeborenen	Differentialdiagnose der Cytomegalie beim Säugling	Differentialdiagnose der Cytomegalie beim älteren Kind und Erwachsenen

Tabl. 3 nach Luthardt, Th. (1977)

Liegt bei einem Neugeborenen der Verdacht auf eine intrauterine Infektion vor, z. B. Cytomegalie, aber auch Röteln, Toxoplasmose u. a., so empfiehlt sich zunächst der Nachweis von IgM-Globulin im Screening-Test, beispielsweise mit „S-Partigen-Immundiffusionsplatten" der Behringwerke, Weippl, G. und Panthischko, M. (1974). Als Suchtest wurde auch der IgM-Latex-Test mit Erfolg angewandt (Rapi-Tex^{R}-IgM, Behringwerke), Antoniadis, G. (1972). Wird die Diagnostik auf Grund sehr frühzeitig auffallender verdächtiger Symptomatik in den ersten 4 bis 6 Lebenswochen vorgenommen, so können serologische Methoden nur sehr bedingt Aufschluß über die ablaufende Infektion geben, weil die Immunantwort junger Säuglinge oft nur unzureichend ist, so daß weder Antikörperanstiege in der Komplementbindungsreaktion (weiterhin KBR), noch spezifische IgM-Antikörper nachweisbar sein müssen, wenn eine Infektion vorliegt, Luthardt, Th. (1977). Ausschließlich der Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern, der nach Luthardt, Th. (1977) aber nur in der Hälfte aller infizierten Kinder gelingt, ist ein sicheres Zeichen für eine floride Infektion, Falke, D. (1977); Luthardt, Th. (1977).
Die Bestimmung dieser antigenspezifischen IgM-Antikörper gegen CMV- läßt sich mit Hilfe der KBR und der indirekten fluoreszenzserologischen Methoden erbringen, Goetz, O. und Peller, P. (1970); Schmitz, H. und Haas, R. (1970). Die Bestimmung der neutralisierenden Antikörper hat sich als Routinemethode bisher nicht allgemein durchgesetzt; sie ist aufwendig und in mancher Hinsicht problematisch, Schmitz, H. und Haas, R. (1970); allerdings ist ihr nach den genannten Autoren eine hohe Spezifität eigen.
Die KBR als die einfachste Methode ist allerdings für diesen Zweck nur bedingt anwendbar, Hofmann, H. (1976). Erst über Monate gleichbleibende oder ansteigende Antikörperwerte in der KBR beweisen eine Cytomegalie nach Hofmann, H. (1976). Weiterhin wird der Wert dieser Nachweismethode dadurch stark eingeschränkt, daß auch bei durch Virusisolierung gesicherten Fällen ein negativer Ausfall der KBR beobachtet wird, Hofmann, H. (1976).
Die Überlegenheit der Immunfluoreszenzmethode gegenüber der KBR beweisen Schmitz, H. und Haas, R. (1970); Betts, R. F. und Mitarb. (1976); Chiang, W. T. und Mitarb. (1970); Navington, J.

(1971); Stagno, S. und Mitarb. (1975); Hofmann, H. (1976). Betts, R. F. und Mitarb. (1976) vergleichen darüber hinaus den IgG-Immunfluoreszenztest mit der KBR (complement-Fixing =CF). Als Antigen werden einmal wieder aufgetaute Zerfallsprodukte von CMV- infizierten Zellen benutzt (freeze-thaw disruption, CF-FT); zum anderen arbeiten die Autoren mit einem mittels alkalischer Glycinpuffer-Inkubation (pH 9,5) gewonnenen Extrakt CMV- infizierter Zellen (glycine buffer, CF-GE), Krech, U. und Mitarb. (1971). Die Immunfluoreszenz- und die CF-GE-Methoden erweisen sich nach Betts, R. F. und Mitarb. (1976) als wesentlich empfindlichere Nachweisverfahren mit höheren Titerwerten als die CF-FT-Methode. Weniger eindrucksvoll stellt sich für Betts, R. F. und Mitarb. (1976) die Überlegenheit der Immunfluoreszenz gegenüber der CF-GE-Methode dar. Die fluoreszenzserologische Antikörper-Bestimmung wurde 1968 von Hanshaw, J. B. und Mitarb. zur Bestimmung von CMV-Antikörper der Immunglobulinkategorie IgM benutzt. Schmitz, H. und Haas, R. (1970) entwickeln das folgende indirekte Immunfluoreszenzverfahren zur Bestimmung von Cytomegalie-Antikörper:

1. Zellkulturen: In der konventionellen Monolayer-Technik werden menschliche embryonale Fibroblastenkulturen (Lunge) gezüchtet. Die Zellen werden in aufeinanderfolgenden Kulturen bis maximal zur 30. Passage gezüchtet. Alle 5 Tage werden mittels Trypsinierung aus einer Kultur zwei Subkulturen angelegt.

2. Nährmedium: In der Regel benutzen Schmitz, H. und Haas, R. (1970) Eagle-BHK-Medium mit 10 % Tryptosephosphat und 10 % fetalem Kälberserum.

3. Virus und Virusvermehrung: Schmitz, H. und Haas, R. (1970) verwenden den Stamm Davis. Auf folgende Weise gewinnen die Autoren infizierte Zellkulturen:
Aus den Monolayer-Kulturen stellen sie durch Trypsinierung Fibroblastensuspensionen her. Diese werden im Verhältnis 5:1 bis 10:1 mit infektiösem Gewebekulturüberstand - Infektionstiter etwa 10^2 $TCID_{50}$ /ml - gemischt und als Monolayer-Kulturen ausgesät. Der relativ niedrige Infektionstiter entsteht nach Schmitz, H.

und Haas, R. (1970) dadurch, daß die Autoren den Gewebekulturüberstand bei -70° C einfrieren und aufbewahren. Sie erhalten jedoch dadurch Kulturen mit möglichst vielen infizierten Zellen, daß sie die infizierten Primärkulturen durch zwei Subkulturen führen, wobei - gleich wie bei den nicht infizierten Zellkulturen - jeweils aus einer trypsinierten Kultur zwei Subkulturen angelegt werden. Die Autoren gehen dann zur Trypsinierung der infizierten Primärkulturen über, wenn deutlich infektiöse Foci erkennbar sind.

4. Anlage von Deckglaskulturen: Schmitz, H. und Haas, R. (1970) entwickeln eine spezielle Ausrüstung, die eine routinemäßige Untersuchung von Seren erlaubt, indem möglichst viele gleichartige Deckglaskulturen angefertigt werden können. In einem offenen Behälter (siehe Abb. 3b) werden 8 Stapel Deckgläser (50 x 7 x 0,2 mm) parallel nebeneinander gestapelt. Ein mit Silikonkautschuk beschichteter längshalbierter Objektträger (75 x 12,5 x 1 mm) wird sodann von oben gegen die Deckglasstapel gedrückt, die auf einer leicht federnden Unterlage ruhen. Auf diese Weise werden mit einem Handgriff 8 Deckgläser an diesen halbierten Objektträger fixiert. (Abb. 3a) Der halbierte Objektträger wird jetzt mit den an ihm haftenden Deckgläsern mit Äther und Alkohol gewaschen, anschließend im Autoklaven sterilisiert. Nach erfolgter Sterilisation werden der halbierte Objektträger samt Deckgläser in eine Plastikpetrischale gegeben, die mit 15 ml infizierter Fibroblastensuspension beschickt wurde und im CO_2-Schrank bei 37° C bebrütet. Nach 2 bis 4 Tagen, wenn die Kulturen genügend gewaschen sind, können Schmitz, H. und Haas, R. (1970) die fluoreszenzserologische Antikörperbestimmung vornehmen. Die Kulturen werden mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und 10 min in Aceton fixiert.

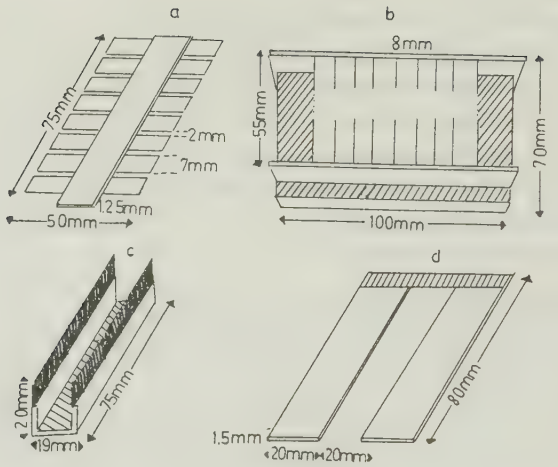


Abb. 3 : Ausrüstung für eine routinemäßige Untersuchung von Seren im Immunfluoreszenztest, aus Schmitz, H. und Haas, R., 1970

Jede einzelne Deckglaskultur wird durch den darüberliegenden halbierten Objektträger in zwei gleiche Hälften geteilt, so daß man mit einigen zusätzlichen Maßnahmen (siehe Punkt 5) pro Petrischale 16 Zellkulturen erhält. Sie lassen sich in 10 % Glycerin-PBS-Lösung bei -25° C mindestens 8 Monate lagern ohne für den Immunfluoreszenztest ungeeignet zu werden, Schmitz, H. und Haas, R. (1970). Die Aufbewahrung der Deckgläser in getrocknetem Zustand bei -70° C hat sich nach den Autoren bewährt.

5. Fluoreszenzmikroskopischer Antikörpernachweis:
Schmitz, H. und Haas, R. (1970) verfahren bei der Bestimmung des Antikörpertiters nach der indirekten Fluoreszenzmethode. Die oben beschriebenen Deckglaskulturen werden aufgetaut und an der Verbindungsstelle der Deckgläschen mit dem Objektträger tragen Schmitz, H. und Haas, R. (1970) mit einer Bürste (Abb.3c) etwas Silikonfett auf, um ein Zusammenfließen der zu testenden Seren zu verhindern. Von Vorteil erweist sich nach den Autoren das Mikrotitersystem bei der Herstellung der Serumverdünnungen, denn dadurch erhalten sie ausreichende Mengen (0,05 ml) Serumverdünnung, um mit Pasteurpipetten die kleinflächigen Deckgläschen mit konstanter Menge zu beschichten.
Nach Auftragen der Serumverdünnungen Inkubation der Deckglaskulturen in feuchter Kammer bei 37° C für 45 min, anschließend einzelne Spülung der Deckgläschen mit PBS, Stehenlassen des gesamten Versuchsansatzes für 15 min bei Zimmertemperatur in einer mit PBS durchströmten Petrischale. Danach auf jedes Deckgläschen Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) - markiertes Antihumanglobulin und eine erneute Inkubation für 15 min bei Zimmertemperatur. Nach Abspülen und Waschen werden die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Fläche auf passend zugeschnittene Objektträger (80 x 20 x 1,8 mm) (Abb. 3d) gelegt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

6. Gewinnung von Antihumanglobulin: In 3wöchigem Abstand erhalten Kaninchen 3 bis 5mal 2 bis 4 mg subcutan Human-Gamma-Globulin (Behringwerke - Marburg) in kompletten Freundschen Adjuvans auf mehrere Stellen des Rückens verteilt injiziert.

3 Wochen nach der letzten Injektion werden die Tiere aus der A. carotis interna entblutet.

7. Markierung mit FITC

Schmitz, H. und Haas, R. (1970) markieren stets die rohe Globulinfraktion der Antiglobulinseren. Die Globulinfraktion wird durch mehrfache Fällung mit 40 % gesättigter Amoniumsulfat-Lösung gewonnen. Bei pH 9,0 und unter Zugabe von 4,5 mg FITC pro 100 mg Protein erfolgt die Konjugation, über Nacht im Kühlschrank bei 4^{o} C auf dem Magnetrührer belassen. Durch Gelfiltration über Sephadex G25 wird anschließend das nicht gekoppelte FITC quantitativ entfernt und die optimal markierte Fraktion durch Chromatographie an DEAE-Cellulose nach der von Voss und Mitarb. (1967) angegebenen Methode isoliert.

8. Einstellung der Gebrauchsverdünnung von FITC-markiertem Antihumanglobulin

Empfindlichkeit und damit die Reproduzierbarkeit des Immunfluoreszenztestes hängen u. a. von der Qualität (Antikörpergehalt, Ausmaß der Markierung mit FITC) des benutzten markierten Antiserums ab. Nur dann sind die mit dieser Nachweismethode ermittelten Werte vergleichbar, wenn die Titerbestimmungen unter annähernd gleichen Bedingungen vorgenommen werden. Schmitz, H. und Haas, R. (1970) verwenden daher die Chargen der FITC-markierten Antihumanglobulinseren stets in einer Verdünnung, bei der unter Verwendung einer positiven Standardserumverdünnung als Kontrolle die Kerneinschlüsse bei der Gesamtverdünnung von 1:200 noch eben spezifisch angefärbt sichtbar sind.

Bei Haas, R. und Mitarb. (1972) gelangt die indirekte Methode in der oben beschriebenen Modifikation zur Anwendung. Diese Autoren arbeiten mit einem positiven Standardserum, dessen Arbeitstiter 1:256 beträgt, ferner wird ein negatives Kontrollserum mitgetestet.

Bei Einhalten dieser Bedingungen und bei Konstantanhalten der Fluoreszenzmikroskopieeinstellung (Kondensor, Filter, etc.), erreichen Schmitz, H. und Haas, R. (1970) eine gute Reproduzierbarkeit der Titerbestimmungen. Als Standardserum verwenden sie menschliches Gammaglobulin der Behringwerke, das

nach ihren Untersuchungen einen sehr gleichförmigen Gehalt an Cytomegalie-Antikörpern besitzt.
Die vorliegenden Ergebnisse der Antikörpertiterbestimmungen gegen CMV mit dem indirekten Immunfluoreszenzverfahren von Schmitz, H. und Haas, R. (1970) zeigen, daß die fluoreszenzserologische Antikörperbestimmungsmethode empfindlicher ist als die von denselben Autoren benutzte Technik der KBR. Sämtliche Seren der fluoreszenzserologischen Titer sind höher, als die mittels der KBR ermittelten. Schmitz, H. und Haas, R. (1970) registrieren keine „unspezifischen Titer", d. h. es werden beim Immunfluoreszenztest keine Antikörper erfaßt, die ihre Bildung einem anderen Stimulans als einer CMV-Infektion verdanken. Dagegen weist Steiner, H. (1974) auf eine Kreuzreaktion hin mit dem Epstein-Barr-Virus, die falsch positive Werte provoziert.
Schmitz, H. und Haas, R. (1970) weisen durch oben beschriebene Methode Kern- und Zytoplasmaeinschlüsse Cytomegalie-infizierter Zellen nach.
Andere Autoren veröffentlichen ähnliche Phänomene, die mittels Immunfluoreszenz und mit histochemischen Methoden nachgewiesen werden, Mc Allister, R. M. und Mitarb. (1963); Rapp, F. und Mitarb. (1963). Schmitz, H. und Haas, R. (1970) halten es für gerechtfertigt, bei der Ermittlung der Fluoreszenztiter nur die Kernfluoreszenz zu berücksichtigen; eine Beurteilung der Zytoplasmafluoreszenz scheint den Autoren nicht oder weniger relevant zu sein. Bei einigen der untersuchten Seren finden Schmitz, H. und Haas, R. (1970) eine auffallende Diskrepanz zwischen den über die Kerneinschlüsse und den über die Zytoplasmaeinschlüsse ermittelten Titern. Dieses Phänomen ist nach den Autoren reproduzierbar und hängt nicht von dem für die Infektion benutzten Virusstamm ab. Schmitz, H. und Haas, R. (1970) vermuten zwei oder mehrere in menschlichen Seren vorkommende Cytomegalieantikörper mit unterschiedlicher Spezifität. Dieses Phänomen wird bereits für das Herpes-simplex-Virus beschrieben, Literatur bei Schmitz, H. und Haas, R. (1970). Für die unterschiedliche Spezifität des CMV in den Kern- bzw. Protoplasmaeinschlüssen können

Hüllproteine (envelopes) verantwortlich sein, die die Cytomegalieviren im Zytoplasma aufweisen, Schmitz, H. und Haas, R. (1970). Da diese Hüllen bei den Herpesviren offensichtlich Bestandteile der infizierten Zellen enthalten, nach Schmitz, H. und Haas, R. (1970), äußern die Autoren die Vermutung, daß die fraglichen „envelope-Antigene" der verschiedenen Herpesviren, wenn diese in speziesgleichen Viruszellen wachsen, untereinander kreuzreagieren. Dadurch würde die weite Verbreitung von Antikörper gegen Zytoplasmaeinschlüsse nach Schmitz, H. und Haas, R. (1970) eine zufriedene Erklärung finden - (die über Zytoplasmafluoreszenz bestimmten Titer liegen wesentlich höher, Schmitz, H. und Haas, R. (1970)). Erweist sich diese Vermutung als richtig, so würde neben der besseren Reproduzierbarkeit auch die höhere Spezifität für die von Schmitz, H. und Haas, R. (1970) geübte Titerbestimmung über die Kerneinschlüsse sprechen.
Neben dem Antikörpernachweis stellt die Virusisolierung vor allem aus dem Urin das beste Diagnostikum dar, Krech, U. und Mitarb. (1968); Stäubli, M. und Mitarb. (1976); Krech, U. und Jung, M. (1971), Goetz, O. und Peiler, P. (1970), Luthardt, Th. (1977). Bei Anwendung des direkten Immunfluoreszenztestes sollten Urin- und auch Speichelproben (Gewebekulturmedium) auf 4° C gekühlt und möglichst schnell auf permissive Zellen (Humanfibroblasten) gebracht werden, Desselberger, U. (1975) und bei 37° C für 1 bis 7 Tage inkubiert werden, Anderson, C. H. und Michaels, R. H. (1972). Von Seren, die Antikörper gegen CMV enthalten - Titer bei Anderson, C. H. und Michaels, R. H. (1972) von 1:512 - werden mittels der Ammoniumsulfat-Ausfällung die antikörperhaltigen Gammaglobulinfraktionen gewonnen und mit FITC konjugiert, Anderson, C. H. und Michaels, R. H. (1972). Das Konjugat wird nach den Autoren optimal 72 Std. nach der Inkubation aufgetragen. Die optimal bestimmte Gebrauchsverdünnung des Konjugats beträgt nach Anderson, C. H. und Michaels, R. H. (1972) 1/4; ferner empfehlen die Autoren die Gegenfärbung mit unverdünntem Rhodaminsulfat bei Raumtemperatur für 30 min . Mittels des auf diese Weise ausgeführten direkten Immunfluoreszenztestes können Anderson, C. H. und Michaels, R. H. (1972) nach ca. 36 bis 48 Std. die Fluoreszenzerscheinungen

auswerten.
Pränatal infizierte Neugeborene scheiden das Virus im Urin aus, während bei subpartal infizierten Neugeborenen bei der anzunehmenden Inkubationszeit von 3 bis 6 Wochen die Virurie erst nach dem ersten Lebensmonat erfolgt, nach Luthardt, Th. (1977). Einzig zuverlässiges Zeichen für eine pränatal stattgehabte Infektion ist also eine Virurie im ersten Lebensmonat, Luthardt, Th. (1977), Falke, D. (1977).

4.2.3. Masern-Virus

Gefürchtet sind bei einer Infektion mit Masernvirus die Fälle, in denen das Zentralnervensystem (ZNS) mitbefallen ist, da bei Masern-Enzephalomyelitiden die Letalität (30-40 %) und die Zahl der Dauerschäden (40 % der Überlebenden) sehr hoch sind, Laboratoriumsblätter, 25 :136 (1975). Viel häufiger sind inapparente Vorgänge, die zuerst an Veränderungen des EEG sichtbar werden und denen später Störungen der psychischen Entwicklung folgen können, Laboratoriumsblätter 25 :136 (1975). Etwa 1 % der an Masern Erkrankten bleibt dadurch geistig zurück, Laboratoriumsblätter, 25 :136 (1975).
Der Nachweis von Antikörpern gegen das Masernvirus ist vor allem in den Fällen unerläßlich, bei denen das typische klinische Bild der Infektion fehlt und eine Differentialdiagnose gegenüber einer Infektion mit anderen Viren, z. B. Röteln, schwierig ist, Laboratoriumsblätter, 25 ;136 (1975). So berichten Dover, A. S. und Mitarb. (1975) von einem atypischen Krankheitsverlauf, bei dem die Masernpneumonie imponierte - oftmals ohne das typische Masernexanthem. Die Autoren können von den stationär behandelten Kindern mit Pneumonie in 18,3 % der Fälle Masern diagnostizieren. Mit der Einführung der aktiven Schutzimpfung gegen Masern in den Jahren 1968-1969 ist die klinische und die schnelle Laboratoriumsdiagnostik sowie die Differentialdiagnose atypischer Masern wesentlich schwerer geworden als in der Zeit vor der Schutzimpfung, Noskovâ, J. und Novák, A. (1971). Da die Isolierung des Masernvirus sowie die serologischen Teste kompliziert

und zeitraubend sind, kommen diese in der klinsichen Praxis nicht in Betracht; die immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung ist hier die Methode der Wahl, Nosková, J. und Novák, A. (1971). Sie hilft nicht nur sehr schnell und relativ einfach die Diagnose von Masern zu stellen, sondern sie ist auch bei der Differentialdiagnose von morbilliformen Exanthemen wertvoll, Nosková, J. und Novák, A. (1971). Die Spezifität dieses Testes ist so hoch, daß ein positiver Ausfall genauso beweiskräftig ist wie eine Virusisolierung, Goetz, O. und Mitarb. (1971). Goetz, O. und Mitarb. (1971) sowie Goetz, O. und Peller, P. (1970) gelingen regelmäßig der Virusnachweis im Prodromalstadium; auch während der ersten beiden Exanthemtage sind positive Ergebnisse häufig. Ab dem 3. Exanthemtag fällt der Test nach Goetz, O. und Mitarb. (1971) nur noch selten positiv, ab dem 5. Exanthemtag immer negativ aus.
Zu ähnlichen Immunfluoreszenztestergebnissen kommen Nosková, J. und Novák, A. (1971) und Fulton, R. E. und Middleton, P. J. (1975). Die Befunde stehen auch mit der klinischen Erfahrung im Einklang: die Infektiosität der Masern ist kurz vor Beginn der Prodromi, im Prodromalstadium und im frühen Exanthemstadium am höchsten, Goetz, O. und Mitarb. (1971).
Goetz, O. und Mitarb. (1971) führen den indirekten Immunfluoreszenztest nach folgendem Verfahren durch - ein ähnliches Immunfluoreszenzverfahren beschreiben Fulton, R. E. und Middleton, P. J. (1975) - :
Aus der Mundhöhle (Epithel der Wangenschleimhaut) gewonnene Zellen werden auf 7 x 30 mm große Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet, 10 min acetonfixiert und anschließend mit 0,1 ml Meerschweinchen-Antimasernserum überschichtet. Inkubation von 30 min bei 37° C in der feuchten Kammer; 3maliges Waschen mit Phosphatpufferlösung für 10 min ; Überschichten der Zellen mit 0,1 ml Antimeerschweinchen-Globulin-Konjugat.
Erneute Inkubation von 30 min bei 37° C; nochmaliges Waschen wie oben und kurzes Spülen mit Aqua bidest. Die Objektträger werden luftgetrocknet. Nach Fulton, R. E. und Middleton, P. J. (1975) Gegenfärbung mit 0,001% Evans-Blau. Nach Goetz, O. und Mitarb.

(1971) werden jetzt die Objektträger auf normal große Objektträger mit der Zellschicht nach unten in Glycerin - Phosphatpuffer 1:9 eingebettet. Die Autoren benutzen das große Zeiss - Photomikroskop mit Quecksilberhöchstdrucklampe HB 0200. Als Okularsperrfilter benutzen sie das Filter 50, als Erregerfilter BG 12/4. In jedem Versuch laufen Kontrollen von Hela - Zellen, die mit Masernviren infiziert sind, sowie auch nicht-infizierte Hela-Zellen mit. Außerdem eine Kontrolle mit Meerschweinchenserum, das keine Masern-Antikörper enthält und eine Kontrolle, die statt Meerschweinchenserum Phosphatpuffer enthält.
Gewinnung der Wangenschleimhautzellen mit Hilfe eines Wattetupfers durch vorsichtiges Reiben von der Wangenschleimhaut oder von Koplikschen Flecken; Ausstreichen auf Objektträger wie oben angegeben. Goetz, O. und Mitarb. (1971) bewahren die Objektträger, wenn die Färbung nicht unmittelbar durchgeführt wird, bei -20° C auf.
Eine der gefürchtesten Komplikationen einer Maserninfektion vor dem zweiten Lebensjahr ist die Subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Es handelt sich um eine persistierende Virusinfektion des ZNS. Das SSPE-Virus ist eng mit dem Masernvirus verwandt, Kreth, H. W. (1976); die Pathogenese der SSPE ist bis jetzt nicht geklärt. die Erkrankung ist extrem selten, während die Durchseuchung mit Masern sehr hoch ist, Kreth, H. W. (1976). Zusätzliche Faktoren müssen nach Kreth, H. W. (1976) dort im Spiel sein, wo sich nach natürlichen Masern eine SSPE entwickelt. Jedenfalls nimmt man heute an, daß die SSPE nicht Folge eines generalisierten oder selektiven Immundefektes ist, Kreth, H. W. (1976). Es scheint, daß in manchen Fällen mehrere Viren vorliegen, einige Autoren vermuten, daß das Epstein-Barr-Virus eine latent vorhandene Maserninfektion zum Ausbruch gebracht haben könnte, Feorino, P. M. und Mitarb. (1975).
Die Diagnose einer SSPE beruht zur Zeit neben der klinischen Symptomatik auf typischen EEG - und Liquorveränderungen, Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971). Außerdem dient der Nachweis von

hohen Masern-Antikörpertitern in Liquor und Serum als diagnostisches Kriterium für die Erkrankung, Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971). Leider sind jedoch diese Befunde häufig in ihrer charakteristischen Ausprägung nicht vorhanden, so daß eine genaue Diagnose nur durch die Hirnbiopsie gestellt werden kann, Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971). Dayan, A. D. und Stokes, M. I. (1971) berichten über den fluoreszenzserologischen Nachweis von Masernvirus-Antigen im Liquor von Patienten, die an einer SSPE erkrankt sind. Die Autoren stellen mit Hilfe der Zytozentrifuge Liquorsediment her und verfahren nach der konventionellen indirekten Immunfluoreszenzmethode. Auf diese Weise kann in kurzer Zeit das für eine akute aseptische Meningitis verantwortliche infektiöse Agens identifiziert werden, Dayan, A. D. und Stokes, M. I. (1971). Dieses fluoreszenzserologische Diagnostikverfahren ist nach Dayan, A. D. und Stokes, M. I. (1971) der Elektronenuntersuchung und der Virusisolierung aus Biopsiematerial überlegen.
Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971) unternehmen vergleichende Untersuchungen von isolierten SSPE-Virusstämmen und stellen in CV_1-Zellen - einer kontinuierlichen Nierenzell-Linie von grünen Meerkatzen -, die mit den SSPE-Viren infiziert sind, im Fluoreszenztest zwei verschiedene Fluoreszenztypen fest: Eine zytoplasmatische Fluoreszenz, in der das Zytoplasma deutlich fluoresziert, während die Zellkerne nicht angefärbt sind und eine nukleare Fluoreszenz, wo zusätzlich zum Zytoplasma die Kerne eine Fluoreszenz aufweisen. Während die Autoren die zytoplasmatische Fluoreszenz immer beobachten können, tritt die Kernfluoreszenz nur nach Anwendung von bestimmten Seren auf. Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971) beobachten diese Kernfluoreszenz nicht nur nach Injektionen der Zellen mit SSPE-Viren, sondern auch nach Injektion mit einem Masern-Wildvirus. Bei Zellinfektion mit einem attenuiertem Masernstamm tritt keine nukleare Fluoreszenz auf, Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971).

Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971) arbeiten mit folgendem Testsystem:

CV_1-Zellen werden nach Injektion mit SSPE- oder Masern- Wildvirus auf Objektträger ausgepflanzt. Nach Auftreten von zytopathogenen Effekten werden die Objektträger geerntet und im Immunfluoreszenztest den entsprechenden Indikatorseren ausgesetzt. Mit Hilfe von Verdünnungsreihen der Testseren können die Fluoreszenztiter bestimmt werden.
Den Autoren erscheint dieser serologische Fluoreszenztest für die Diagnose einer SSPE sehr brauchbar zu sein, denn er ist einfach durchzuführen und gut zu interpretieren. Das Phänomen der Nuklearfluoreszenz wird von den Autoren diskutiert, es ist in seiner Bedeutung und seiner Entstehung noch nicht ganz aufgeklärt, Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971). Die Untersuchungsergebnisse von Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971) zeigen, daß die Antikörper, die eine nukleare Fluoreszenz hervorrufen nach unkomplizierten Masern in kurzer Zeit verschwinden. Wenn daher bei einem Patienten mit der Verdachtsdiagnose einer SSPE diese Antikörper gefunden werden, so können sie mit als diagnostisches Kriterium herangezogen werden, Ter Meulen, V. und Mitarb. (1971).

4.2.4. Respiratory-Syncytial -(RS-)Viren, Influenza-, Parainfluenzaviren

Viele Autoren berichten über die erfolgreiche und schnelle Diagnose von Influenza A und B mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik, u. a. Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970); Marks, M. I. und Mitarb. (1971).
Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970) weisen nach, daß Nasopharyngialsekret sich zum fluoreszenzserologischen Nachweis einer Influenza A-Infektion besser eignet und eine weitaus reichhaltigere Virusquelle darstellt als Husten- bzw. Nasalabstriche. Die Immunfluoreszenz liefert auf virusinfizierten Affen-Nierenzellkulturen bereits dann positive Befunde, wenn die KBR wegen zu geringer Viruskonzentration noch nicht aussagefähig ist, Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970)
Die gleichen Erfahrungen machen die genannten Autoren beim fluoreszenzserologischen Nachweis einer Infektion mit Respiratory-Syncytial (RS-) -Viren. Als besonders hilfreich erweist sich nach Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970) der Immunfluoreszenztest zum Influenza A- Nachweis an Autopsiematerial;

selbst dann gelingt fluoreszenzserologisch der Antikörpernachweis, wenn das Virus selbst nicht mehr isoliert werden kann. Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970) zitieren Autoren, die über ähnliche Untersuchungsergebnisse berichten. Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970) gelingt ferner mittels Immunfluoreszenztest auf Affen-Nierenkulturen der gleichzeitige Nachweis einer Infektion mit Influenza A- und RS-Viren. Unterschiedliche Kern- oder Zytoplasmafluoreszenz und der gemischte Gebrauch von Influenza A- und RS-Viren ermöglichen diese Virusdifferenzierung.
Gardner, P. S. und Mitarb. (1970) berichten über das gleichzeitige Vorkommen von RS- und Influenza A-Viren. Diese Forschergruppe fand heraus, daß RS-Viren nicht in der Lage sind, die Interferonbildung anzuregen; diese Tatsache könnte die sekundäre Influenza A-Infektion bei bereits im Respirationstrakt vorkommenden RS-Viren erklären, Gardner, P. S. und Mitarb. (1970); Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970). Die zuletzt genannten Autoren empfehlen, den fluoreszenzserologischen Influenzavirus-Nachweis in die Routine-Laborarbeit aufzunehmen, besonders wenn sich bereits der Immunfluoreszenztest auf RS-Viren etabliert hat. Gleichzeitig kann mit demselben Testverfahren die Parainfluenzainfektion nachgewiesen werden, Mc Quillin, J. und Mitarb. (1970); Gardner, P. S. und Mitarb. (1970).
Isolierung und Identifizierung dieser bei Kindern weit verbreiteten pathogenen Viren mit Hilfe der virologischen Standard-Techniken sind zeitraubend.
Marks, M. I. und Mitarb. (1971) beschreiben in vivo und in vitro-Untersuchungen, in denen sie mittels der direkten Immunfluoreszenztechnik in nasalen Epithelzellen Parainfluenzaviren nachweisen.
Nagahama, H. und Mitarb. (1970) weisen mit derselben Untersuchungstechnik RS-Viren nach. Marks, M. I. und Mitarb. (1971) berichten über Autoren, die eine homogene Zytoplasmafluoreszenz in Parainfluenza-infizierten Affennieren-Zellen beobachten, während andere eine Kern- und Zytoplasmafluoreszenz in Parainfluenza-3-infizierten Zellreihen beschreiben. Marks, M. I. und Mitarb. (1971) können in ihren Untersuchungsreihen 75% der an Parainfluenz-

Typ 3 erkrankten Kinder mittels des direkten Immunfluoreszenztestes diagnostizieren. Die Autoren diskutieren die Grenzen dieses Testverfahrens und seine Fehlerquellen. Sie betonen die Notwendigkeit, die fluoreszenzserologischen Testergebnisse mit der klinischen Symptomatik zu vergleichen. Über Untersuchungen auf Parainfluenza-Infektionen mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes auf Objektträger-Mikrozellkulturen berichten Stevens, T. D. und Whatkins, H.M.S. (1969).

4.3. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Parasitologie - Protozoen

4.3.1. Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii, der Erreger der Toxoplasmose, ist der auf Erden am weitesten verbreitete Parasit des Menschen, Aspöck, H. (1976). Die Toxoplasma-Infektion wird meist durch den Genuß ungenügend gekochten Fleisches, in geringem Maße durch Kontakt mit Katzen erworben, da der Katzenkot infektiös sein kann, Merkblatt Nr. 20 des DÄV (1973). Infektionen mit diesem Erreger sind daher häufige Ereignisse; die durchschnittlichen Durchseuchungsraten verlaufen proportional dem Lebensalter, d. h. von den Zwanzigjährigen sind etwa 20 %, von den Fünfzigjährigen etwa 50 % usw. im Laufe ihres Lebens mit dem Erreger in Kontakt gekommen, Aspöck, H. (1976); Falser, N. und Mitarb. (1974). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle verläuft die Infektion klinisch fast oder völlig unauffällig, nur serologisch feststellbar, die spontan in ein Latenzstadium übergehen kann, Aspöck, H. (1976); Merkblatt des DÄV Nr. 20 (1973). Ernste Verlaufsformen im Erwachsenenalter sind selten, Aspöck, H. (1976).
Die besondere Bedeutung von Toxoplasma gondii ist die Fähigkeit des Parasiten, auf diaplazentarem Weg die Frucht zu infizieren, Aspöck, H. (1976); Robertson, P. W. und Kertesz, V. (1975); Dahm, H. (1974); Kräubig, H. (1976); Piekarski, G. und van der Zypen, E. (1967); Remington, J. S. (1969). Dabei kann es zu schweren Schäden kommen, im typsichen Falle zur klassichen Trias:

Hydrozephalus, intrazerebrale Verkalkung und Chorioretinitis (evtl. begleitet von meningoenzephalitischen Erscheinungen), Piekarski, G. und van der Zypen, E. (1967); Kräubig, H. (1976). Großes Augenmerk erfordern vor allem aber auch jene Kinder, die im Stadium eines postenzephalitischen Schadens geboren werden, zunächst klinisch unauffällig sind, bei denen sich jedoch im Verlauf der ersten Lebensjahre die durch die pränatale Toxoplasma-Infektion erfolgten Schädigungen (etwa geistige Retardation) manifestieren, Aspöck, H. (1976); Kräubig, H. (1976). Wird eine während der Gravidität erstmals erfolgte Toxoplasma-Infektion nachgewiesen, so muß trotz Behandlung der Schwangeren, und auch, wenn eine normale Geburt vorliegt, das Neugeborene untersucht werden, um auch klinisch zunächst unauffällige Infektionen zu erfassen, Kräubig, H. (1976). Man geht dabei diagnostisch mit einer Bestimmung der IgM- und IgA-Antikörper unter Verwendung von S-Patigen^{R}-Platten vor, Aspöck, H. (1976), Antoniadis, G. (1972); Tympner, K.-D. (1971), Remington, J. S. (1969); Remington, J. S. und Desmonts, G. (1973). Dieser quantitativen spezifischen Bestimmung kann als einfach durchzuführender „Screeningtest" ein Latex-IgM-Test (Rapi Tex^{R}-IgM, Behringwerke, Marburg / Lahn) vorgeschaltet werden, Tympner, K.-D. und Neuhaus, F. (1972); Tympner, K.-D. (1971). Der Nachweis von nicht plazentagängigen IgM-Antikörpern durch Rapi Tex^{R}-IgM im Serum von Neugeborenen (innerhalb der ersten 5 Tage) gibt einen deutlichen Hinweis auf eine intrauterine Infektion, Werner, H. Bundesgesundheitsblatt, 18, (1975).
Die Toxoplasmose wird in der Regel mit Hilfe der serologischen Methoden diagnostiziert, Falser, N. und Mitarb. (1974). Die intrazelluläre Lebensweise von Toxoplasma gondii, Fuhr, R. (1974), ist der Grund dafür, daß der Erreger nur selten direkt nachgewiesen werden kann, Fuhr, R. (1974); Nicolle, C. und Manceaux, L. (1908). Als geeignete Testverfahren erweisen sich besonders der Serofarbtest nach Sabin-Feldman (SFT), Sabin, A. B. und Feldman, H. A. (1948) und der indirekte Immunfluoreszenztest; Mansjoer, H. (1971); Fuhr, R. (1974 und 1976); Goldman, M. (1957); Fulton, J.D. und Voller, A.(1964); Kelen, A. E. und Mitarb. (1962); Sylvester, B. und Mitarb. (1975).

Beide Testverfahren, der SFT und der Immunfluoreszenztest sind gleichermaßen sensitiv, sie erfassen vermutlich identische Antikörper und sind daher direkt vergleichbar, Fuhr, R. (1974); Aspöck, H. (1976). Bei sorgfältiger Durchführung erbringt der Immunfluoreszenztest - von einzelnen Fällen abgesehen - die gleichen Antikörpertiter wie der SFT oder variiert nur um eine Titerstufe nach oben oder unten, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976); Fuhr, R. (1974). Neben der Titerhöhe stimmt auch der Titerverlauf nach beiden Testverfahren überein, Mansjoer, H. (1971). Der SFT läßt sich daher weitgehend durch den Immunfluoreszenztest ersetzen, Werner, H. Bundesgesundheitsblatt, 18 (1975).
Während die Durchführung des SFT jedoch technisch aufwendig und gefährlich und somit für viele kleine Laboratorien nicht praktizierbar ist, bietet der Immunfluoreszenztest im Vergleich gewisse Vorteile, Fuhr, R. (1974). Diese Vorteile nach Fuhr, R. (1974) und Braveny, I. und Disko, R. (1976) lassen sich insgesamt folgendermaßen zusammenfassen:

1. Für das durchführende Personal ist er ungefährlich, da keine infektionstüchtigen (vielmehr abgetöteten) Erreger als Antigen benutzt werden. Dazu bietet der Immunfluoreszenztest gleiche Empfindlichkeit und Spezifität wie der SFT.

2. Er benötigt kein Aktivatorserum, das schwierig zu beschaffen ist.

3. Offenbar tritt kein Prozonen-Effekt auf.

4. Er kann in jedem Labor durchgeführt werden, das über Erfahrungen mit der Immunfluoreszenzmikroskopie verfügt. Und die Reaktion ist leichter zu erlernen als der SFT.

5. Das Antigen kann gekühlt lange gelagert werden.

6. Mit der gleichen Technik läßt sich getrennt die IgM-Antikörperklasse bestimmen. So können aktiv intrauterin gebildete Antikörper bei der kongenitalen Infektion erfaßt werden, Braveny, I. und Disko, R. (1976).

7. Wiederholte Betrachtungsmöglichkeit auch noch nach Tagen ohne Beeinträchtigung der Fluoreszenz.

8. Er kann ökonomischer durchgeführt werden und mit geringerem Zeitaufwand durch Fortfall der Gewinnung von frischen Exsudaten.

Eine wichtige Ergänzung zum hochempfindlichen und spezifischen SFT und dem Immunfluoreszenztest stellt die Komplementbindungsreaktion (KBR) dar, Bundesgesundheitsblatt, 10, (1975); Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976). Dieses Testverfahren kann jedoch den SFT oder den Immunfluoreszenztest nicht ersetzen, da mit ihm latente Infektionen nicht erfaßt werden, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976). Positive Ergebnisse mit der KBR bieten zusammen mit den Ergebnissen des SFT und des Immunfluoreszenztestes Hinweise auf das Vorliegen einer akuten Toxoplasmainfektion, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976); Werner, H., Bundesgesundheitsblatt, 18, (1975). Es hat sich bestätigt, daß die Durchführung der KBR zusammen mit dem SFT oder dem Immunfluoreszenztest erforderlich ist, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976). In den Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktion mittels Mikromethode (1976) wird auf die notwendige Kombination von KBR und SFT oder Immunfluoreszenztest als sogenanntes „Diskrepanz-Verfahren" im Rahmen der klinischen Bewertung besonders hingewiesen. Dieses Auswertungsverfahren der Ergebnisse der Toxoplasma-Serologie hat sich nach Braveny, I. und Disko, R. (1976) sehr gut bewährt. Voraussetzung für die Erarbeitung dieser Kriterien war die methodisch einheitliche Durchführung der erwähnten Test-Reaktionen. Nur so waren die Ergebnisse verschiedener Laboratorien miteinander vergleichbar und konnten durch laufend durchgeführte Ringversuche abgesichert werden, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976). Die meisten Laboratorien haben nach den Empfehlungen gearbeitet, die durch eine Sachverständigen-Kommission des Bundesgesundheitsamtes 1966 zur Durchführung des SFT und der KBR ausgearbeitet wurden. Durch dauernde Zusammenarbeit dieser Laboratorien konnte eine weitgehende Standardisierung der Methoden und somit Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielt werden.

Die beratende Kommission des Bundesgesundheitsamtes hat für den indirekten Immunfluoreszenztest ebenfalls Richtlinien ausgearbeitet, die 1977 veröffentlicht wurden. Auf diese „Empfehlungen" sei im Besonderen hingewiesen; Einzelheiten über erforderliche Reagenzien mit Rezepten für diese Reagenzien, über die Präparation der Objektträger und der Durchführung des Immunfluoreszenztestes können den oben erwähnten Mitteilungen des Bundesgesundheitsamtes, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976), entnommen werden.
Im folgenden werden die Faktoren diskutiert, die im wesentlichen das Ergebnis der Fluoreszenzreaktion beeinflussen, nach Braveny, I. und Disko, R. (1976). Es sind folgende Faktoren zu nennen:

1. Reagenzien
2. Durchführung des Immunfluoreszenztestes
3. Mikroskop

Zu 1. Reagenzien:
Es gibt auf dem Markt verschiedene Produkte (z. B. Parasitologische Reagenzien, Behringwerke; Hyland Travenol, Fluoro-Kit), sie sind als Einzelreagenzien oder als Kits oder Sets erhältlich. Das FITC-markierte Antihumanglobulin wird entweder konzentriert (mit oder ohne Titerangabe) oder in der Gebrauchsverdünnung mit Evans Blau versetzt geliefert. Konzentrierte Konjugate, die nicht ausdrücklich für den Toxoplasmatest bestimmt sind, enthalten wegen der allgemeinen Durchseuchung der Tiere mit Toxoplasmen oft Antikörper, Braveny, I. und Disko, R. (1976). Da auch der Markierungsgrad des Antihumanglobulins und seine Arbeitsverdünnung das Ergebnis der Reaktion beeinflussen, muß dieses Serum regelmäßig vor Gebrauch ausgetestet werden, Braveny, I. und Disko, R. (1976); Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976). Toxoplasma-Antigen kann entweder aus Mäuseexsudat oder Gewebekulturen gewonnen werden, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976); Sylvester, B. und Mitarb. (1975). Besonders aus Zellkulturen lassen sich gute Antigene herstellen, Braveny, I. und Disko, R. (1976). Fuhr, R. (1974) erhält die deutlichsten und klarsten Fluoreszenzbilder mit Toxoplasmen aus Hela-Zellkulturen, während sich bei den aus Mäuseexsudat (Peritonealexsudat) gewonnenen Toxoplasmen stärkere Hintergrundfluoreszenz und die größere Anzahl störender Partikel bemerkbar macht, Fuhr, R. (1974). Von

Bedeutung sind Haltbarkeit und Validität der Antigenpräparate. Fuhr, R. (1976) berichtet über Langzeitkonservierung und Lagerung von gebrauchsfertigen Antigenen auf Objektträgern. Ziel der Untersuchungen von Fuhr, R. (1976) ist es, Lagerungsverluste zu vermeiden und die Haltbarkeit von Antigenen zu verlängern; dazu entwickelt Fuhr, R. (1976) folgendes patentrechtlich geschützte Verfahren (Patentnummern: P 254 103 1, 5, G 752 9140, 6, P 250 8176, 9, G 750 5851, 4).
Das Antigen-Toxoplasmen-Suspension wird auf vorbereitete Objektträger (teflonbeschichtet mit kleinen kreisförmigen Aussparungen) gebracht, indem es in einer vorher bestimmten Dichte auf die Teflonaussparungen aufgetropft, luftgetrocknet und für 10 min in reinem Methanol fixiert wird. Die Objektträger werden in Ständer gebracht, getrocknet und kommen für 2 Std. in die Tiefkühltruhe (ca. -20° C oder tiefer) und anschließend sofort in den Lyophilisator, wo sie bis zur vollständigen Trocknung verbleiben. Nach der Entnahme werden sie sofort in vorbereitete Taschen aus gasdichter Alufolie mit doppelseitiger PVC-Beschichtung eingelegt, die nur noch an der Schmalkante offen sind. Die vorhandene Luft wird mit Hilfe einer an einer Vakuumflasche angeschlossenen Kanüle abgesaugt, bis sich die Folie ganz eng an den einliegenden Objektträger angepreßt hat und dieser sich deutlich herausmodelliert.
Die noch nicht geschlossene Seite wird dann mit einem Kunststoffschweißgerät versiegelt. Es ist nach Fuhr, R. (1976) wichtig, daß diese Arbeitsgänge möglichst schnell erfolgen, um eine Rehydrierung durch die Luftfeuchtigkeit zu vermeiden. Optimalere und konstantere Ergebnisse konnten von Fuhr, R. (1976) erzielt werden mit einem Lyophilisierapparat als Groß-Haupttrockner und einem Nachtrockner mit eingebauter Folienschweißeinrichtung in mehreren Etagen. Dieses Verfahren empfiehlt sich nach Fuhr, R. (1976) deshalb für größere Serien, um die Herstellungsqualität zu optimieren und die Herstellungskosten zu minimieren. Fuhr, R. (1976) beweist, daß mit seinem Konservierungsverfahren noch nach einer Lagerungszeit bis zu 54 Wochen eine gute Erhaltung der antigenen Determinanten der Toxoplasmen gewährleistet ist. Mit diesem Verfahren sollen der serologischen Diagnostik gebrauchsfertige Antigene zur Verfügung gestellt werden, die für

die Immunfluoreszenz keiner weiteren Vorbereitung mehr bedürfen, sondern nur noch mit dem zu testenden Serum zu überschichten sind, Fuhr, R. (1976). Von großer Wichtigkeit ist dabei die Verlängerung der Lagerfähigkeit auf die Zeit bis zu einem Jahr und die dadurch erleichterte Bedarfsplanung. Die parasitologischen Reagenzien der Behringwerke suchen diesem ökonomischen Faktor gerecht zu werden, indem sie den Reagenzien für den Toxoplasma-Immunfluoreszenztest eine Lagerung bei etwa $+4^{\circ}$ C bis $+6^{\circ}$ C eine Laufzeit von 1 Jahr bescheinigen.
Auf dem Wege zu einer Standardisierung des Immunfluoreszenztestes empfiehlt das Bundesgesundheitsamt, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976), daß das ganze Reaktionsfeld mit 0,01 ml (etwa 10 - 20 000 Trophozoite) einer Toxoplasmen-Suspension bedeckt wird, um eine gleichmäßige Verteilung der Toxoplasmen nach dem Auftrocknen zu garantieren. Bei dieser Dichte sind 10 - 20 Parasiten bei 250facher Vergrößerung im Blickfeld zu beobachten. Nach Braveny, I. und Disko, R. (1976) ist es empfehlenswert, vor Einführung des Testes mehrere Marktprodukte zu vergleichen, da nach ihrer Erfahrung nicht alle Substanzen einwandfrei sind. Fehlresultate können auch dadurch hervorgerufen werden, daß Reagenzien verschiedener Herkunft in einem Testansatz verwendet werden, Fuhr, R. (1976). So sind z.B. die Reagenzien der Behringwerke auf einander abgestimmt.

Zu 2. Durchführung des Immunfluoreszenztestes:
Bei der Herstellung der Serum-Verdünnungsreihe empfehlen Braveny, I. und Disko, R. (1976) die beim SFT üblichen Titerstufen einzuhalten:

1 : 4	1 : 256
1 : 16	1 : 1000
1 : 64	1 : 4000

Hierbei hat sich die Anwendung der Mikrotechnik besonders gut bewährt, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976). Bei geringerem Zeit- und Arbeitsaufwand werden außerdem kleinere Mengen an Reagenzien benötigt. Halb- und Mikrotitervollautomaten haben sich laut Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976) nicht bewährt.
Sylvester, B. und Mitarb. (1975) beschreiben eine Modifikation des Immunfluoreszenztestes für den Nachweis von Toxoplasmaantikörper. Es wird auf eine Titerbestimmung verzichtet, und aus

einer einzigen Verdünnungsstufe (1:4) wird der Antikörpergehalt des Patientenserums mit Hilfe von zwei Kriterien bestimmt:

1. Bei gleicher Toxoplasmenanzahl im Präparat wird je nach Antikörpergehalt eine bestimmte Menge von Toxoplasmen mit Antikörpern besetzt.
2. Die Stärke der Fluoreszenz ist je nach Antikörpergehalt unterschiedlich und kann mit Hilfe von bekannten Kontrollseren einem bestimmten Antikörpergehalt zugeordnet werden.

Diese Bewertungskriterien finden ihren Niederschlag in den Ergebnissen des Fluoreszenzantikörpertestes auf Toxoplasmen (FATOX), die in Helligkeitsgraden ausgedrückt werden, Sylvester, B. und Mitarb. (1975) Diese Autoren berichten über vergleichende serologische Untersuchungen mit drei verschiedenen Modifikationen des Immunfluoreszenztestes. Sylvester, B. und Mitarb. (1975) stellen fest, daß auch Titer ab 1:1000 zu differenzieren sind, indem die Zahl der im Präparat fluoreszierenden Toxoplasmen zu den nicht fluoreszierenden in Beziehung gesetzt werden kann zum Antikörpergehalt des Serums und unter Zunnahme der Fluoreszenzintensität. Diesen Test bezeichnen Sylvester, B. und Mitarb. (1975) als FATOX III. Die Untersuchungen der Autoren ergeben, daß sich SFT und FATOX III gleichartig verhalten; und es besteht ebenso zwischen KBR und FATOX III die gleiche Relation wie zwischen KBR und SFT. FATOX weist damit die gleiche Empfindlichkeit und Spezifität auf wie SFT, Sylvester, B. und Mitarb. (1975).

Zu den Vorteilen des Immunfluoreszenztestes gegenüber dem SFT kommen nach Sylvester, B. und Mitarb. (1975) weitere Vorteile hinzu bei Anwendung von FATOX III:

1. Wegfall der Austitration und der dadurch bedingten Fehlerquellen.
2. Geringerer Verbrauch von Antigen und damit geringerer Verbrauch von mit Antigen beschichteten Objektträgern, da pro Patient nur ein Toxoplasmenplaque benötigt wird.
3. Erleichterung für den Diagnostiker, da nur noch ein Plaque pro Patient durchzumustern und zu beurteilen ist.

Eine kritische Stellungnahme zu diesem modifizierten Immunfluoreszenztest folgt im Zusammenhang im nächsten Abschnitt.

Braveny, I. und Disko, R. (1976) weisen auf folgende Kriterien hin, die bei der Ablesung der Fluoreszenzbilder eingehalten werden sollen:

Stark positive Reaktion: intensive gelb-grüne Fluoreszenz des ganzen Parasiten, oder auch Randfluoreszenz gegenüber dem roten Zellinneren.

Schwach positive Reaktion: schwache, aber kontinuierliche Randfluoreszenz.

Negative Reaktion: keine Fluoreszenz oder grüne Randfluoreszenz ist sehr schwach und umfaßt nicht die ganze Zelle.
Als ebenfalls negative Reaktion ist das Aufleuchten nur eines Poles - „TAP" (= Toxoplasma anterior polar) - Phänomen - zu werten, Braveny, I. und Disko, R. (1976).

Die Ablesung des Immunfluoreszenztestes muß sich am negativen und am positiven auf das Standardserum abgestimmte Kontrollserum orientieren, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976).

zu 3. Mikroskop:
Das Ergebnis des Immunfluoreszenztestes kann entscheidend vom optischen System: Mikroskop mit der geeigneten Lampe und Filterkombinationen - beeinflußt werden, Braveny, I. und Disko, R. (1976). Diese genannten Autoren prüfen in einer Untersuchungsreihe verschiedene optische Ausrüstungen:

1. Zeiss-Auflicht (Zeiss - A): Standard 18 mit Auflichtkondensor IV FL. Quecksilber-Höchstdrucklampe HB050, Blaulichtanregung (FITC) - Vielschicht-Interferenzfilter BP 455-490, Teilerspiegel FT 150, Sperrfilter LP 520.
2. Zeiss Durchlicht (Zeiss - D): Standard GFL, Fluoreszenzleuchte II (mit HBO 200)
   Blaulichtanregung (FITC) -Vielschicht-Interferenzfilter KP 500, Ultrakondensor 1,2- 1,4; Sperrfilter 50 oder 53.

3. Leitz-Auflicht (Leitz -A.): Orthoplan mit dem Auflichtilluminator nach Ploem, Quecksilberlampe HBO 200, Blaulichtanregung mit Interferenzfilter KP 500 mit zugeordnetem Sperrfilter K 510.

4. Wild-Forschungsmikroskop: M 20 mit Durchlichtbasis mit Halogenbeleuchtung 12 Volt 100 W FITC-Sperrfilter.

Braveny, I. und Disko, R. (1976) stellen im Zeiss-Auflichtmikroskop immer die höchsten Werte fest. Es ergeben sich erhebliche Unterschiede bei der Titerbestimmung im Immunfluoreszenztest; vor allem zwischen dem Zeiss-Auflicht- und dem Wild-Mikroskop können die Autoren Unterschiede bis zu 3 Titerstufen registrieren. Diese Tatsache zeigt den bedeutenden Einfluß, den das Mikroskop auf die Ergebnisse der Fluoreszenzreaktion hat, Braveny, I. und Disko, R. (1976).
Diese Untersuchungsergebnisse entsprechen den Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes (1976), in denen das Ablesen der Ergebnisse im Fluoreszenzmikroskop bei auffallendem Licht empfohlen wird und unter Verwendung einer Quecksilber-Höchstdrucklampe und eines geeigneten Erregerfilters, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976).
Im Zusammenhang mit der Forderung nach Standardisierung kann nicht erwartet werden, daß in jedem Untersuchungslabor die gleichen Mikroskope mit der gleichen Filterkombination Verwendung finden. Es sollen vielmehr veralterte Lichtquellen und Filterkombinationen auf den neuesten technischen Stand gebracht werden, Braveny, I. und Disko, R. (1976), damit das Erregerlicht besser ausgenutzt werden kann. Braveny, I. und Disko, R. (1976) empfehlen ein Standardserum für den Immunfluoreszenztest, das vom Institut für Medizinische Parasitologie der Universität Bonn bezogen werden kann. Das Mikroskop kann nach Braveny, I, und Disko, R. (1976) als geeignet gelten, wenn mit diesem Standardserum der angegebene Titerwert erreicht wird.
Eine Nomenklaturänderung : „Internationale Einheit" - an Stelle von Titer - halten Braveny, I. und Disko, R. (1976) nicht für einen Beitrag zur Genauigkeit, eher zur Verwirrung, zumal da die Titerbestimmung bei Toxoplasmose ungleich größere Bedeutung hat als beispielsweise bei der Lues.

Eine andere Neueinführung tritt nach Meinung von Braveny, I. und Disko, R. (1976) der angestrebeten Standardisierung als Hindernis entgegen: der modifizierte Immunfluoreszenztest nach Sylvester, B. und Mitarb. (1975). Wie oben beschrieben, wird auf die Titerbestimmung verzichtet und die Stärke der Fluoreszenz in einer einzigen Verdünnungsstufe (1:4) einem bestimmten Antikörpergehalt zugeordnet. Die erwähnten Vorteile dieses Testverfahtens sind zwar zutreffend, die angestrebte Standardisierung aber wird erschwert, Braveny, I. und Disko, R. (1976). Das Ablesen der Titerstufen bei der Fluoreszenzreaktion ist von subjektiven Schwankungen belastet und stellt naturgemäß eine Fehlerquelle dar, Wick, G. und Mitarb. (1976). Die optisch klare und eindeutige Beurteilung der positiven Reaktion bleibt ein Vorteil des SFT, Braveny, I. und Disko, R. (1976); Sabin, A. B. und Feldman, H. A. (1948); Fuhr, R. (1974). Demgegenüber wurden die Vorteile der indirekten Immunfluoreszenzreaktion an vorhergehender Stelle aufgezählt und beschrieben.

Mit Hilfe serologischer Methoden lassen sich Toxoplasma-Infektionen mit großer Zuverlässigkeit feststellen. Eine wesentliche Voraussetzung ist die richtige Interpretation der verschiedenen Reaktionen. Abb. 4 zeigt den Titerverlauf von SFT. Immunfluoreszenztest und KBR:

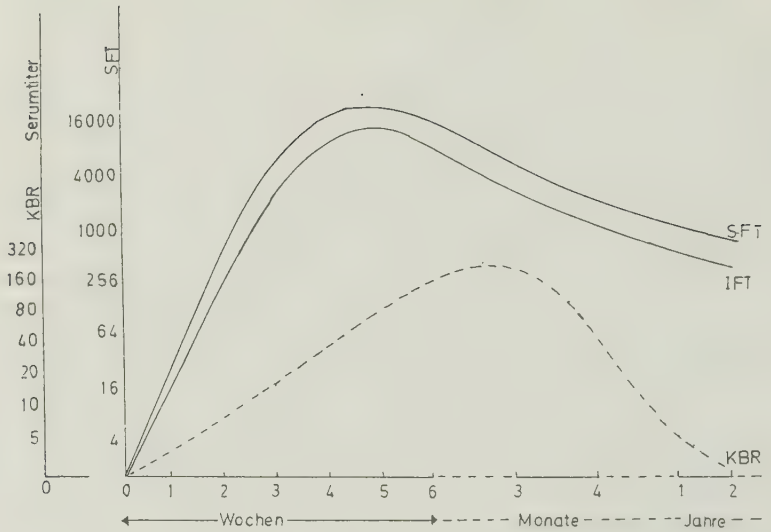


Abb. 4 : Titerverlauf von SFT, IFT und KBR bei einer Toxoplasma-Infektion, aus Braveny, I.und Disko, R., 1976

Der positive Ausfall von SFT und Immunfluoreszenztest in niedrigen Titerstufen (bis 1:256) zeigt an, daß zu irgendeinem Zeitpunkt eine Toxoplasma-Infektion stattgefunden hat, Piekarski, G. und Finger, H. (1974). Erst wenn mittels SFT oder des Immunfluoreszenztestes hohe Titer (bis 1: 64 000) ermittelt werden, ist an eine akute Infektion zu denken, zumal wenn eine zu einem früheren Zeitpunkt aufgetretene Toxoplasmose ausgeschlossen ist, Piekarski, G. und Finger, H. (1974). Im Verlauf einer Toxoplasma-Infektion steigen die im SFT- oder im Immunfluoreszenztest feststellbaren Antikörper in wenigen Wochen über mittlere auf hohe Werte an und bleiben über Monate bestehen, um dann allmählich - meist im Verlauf eines Jahres - auf mittleren und später wieder auf niedrige Titerwerte abzusinken, Braveny, I. und Disko, R. (1976).
Eine einmalige Untersuchung erlaubt, wie aus dem Kurvenverlauf des Abb. 4 ersichtlich, keine Aussage über die Aktualität der Infektion, wenn die Titerwerte unter 1: 1000 liegen, Braveny, I. und Disko, R. (1976). Daher ist es empfehlenswert, bei Titerwerten bis 1:1000 im Immunfluoreszenztest eine zweite Reaktion durchzuführen, nämlich die Komplementbindungsreaktion (KBR), Piekarski, G. und Finger, H. (1974); Braveny, I. und Disko, R. (1976). Liegen die Titerwerte in der KBR über dem Titer 1:10, so kann mit großer Wahrscheinlichkeit eine frische Toxoplasma-Erkankung angenommen werden, Braveny, I. und Disko, R. (1976). Die Durchführung beider Reaktionen: KBR und Immunfluoreszenztest bzw. SFT ist also erforderlich. Die KBR kann den SFT oder den Immunfluoreszenztest nicht ersetzen, da mit ihr latente Infektionen nicht erfaßt werden, denn selten werden in diesem Falle bei der KBR Titerwerte von 1:10 überschritten, Piekarski, G. und Finger, H. (1974); Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976).
Das Diskrepanz-Auswertungsverfahren der Ergebnisse der Toxoplasma-Serologie, d.h. gleichzeitige serologische Untersuchung mittels Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden: KBR in Kombination mit SFT oder Immunfluoreszenztest, dieses Diskrepanzverfahren wird von der Sachverständigen-Kommission des Bundesgesundheitsamtes (1976) empfohlen und hat sich nach bisheriger Erfahrung

gut bewährt, Bundesgesundheitsblatt, 20, (1976); Braveny, I. und Disko, R. (1976).
Für die Bewertung eines Ergebnisses bei einmaliger serologischer Untersuchung gelten im Prinzip folgende Kriterien unter Berücksichtigung der Tatsache, daß etwa 11 Tage nach einer Toxoplasma-Infektion, - unabhängig davon, ob es zur Erkrankung kommt -, mit dem SFT oder dem Immunfluoreszenztest Toxoplasma-antikörper nachweisbar werden, die in der Regel zwischen der 2. und 3. Woche ihr Maximum erreichen, nach Piekarski, G. und Finger, H. (1974):

1. SFT oder Immunfluoreszenztest negativ:
   Es liegt keine Toxoplasma-Infektion vor. Im Falle der Schwangerschaft derzeit keine Gefahr für die Frucht, jedoch kein Schutz vor Toxoplasma-Infektion der Mutter. Cave: rohes Fleisch, Kontakt mit Katzen, bes. Katzenkot, Aspöck, H. (1976).
2. SFT oder Immunfluoreszenztest - Titer bis 1:256; KBR-Titer bis 1:5 :
   Diese Befunde sind als latente Toxoplasma-Infektion zu werten und erlauben alleine keinen Verdacht auf das Vorliegen einer Erkrankung. Bei klinischen Symptomen ist eine sofortige Wiederholungsuntersuchung angezeigt. Sollten derartige Symptome mit einer manifesten Toxoplasma-Infektion in kausalem Zusammenhang stehen, so darf erwartet werden, daß die Antikörper-Titer zwischenzeitlich um mindestens 2 Stufen angestiegen sind, Aspöck, H. (1976); Piekarski, G. und Finger, H. (1974); Dahm, H. (1975).
3. SFT - oder Immunfluoreszenztest-Titer zwischen 1:1000 und 1: 64 000; KBR-Titer zwischen 1:10 und 1:320 :
   Es besteht begründeter Verdacht für eine manifeste akute oder chronische Toxoplasmose. Eine kausale Therapie ist nur bei entsprechender klinischer Symptomatik erforderlich. Allerdings kann es sich bei derartigen serologischen Befunden auch um eine symptomlose frische Infektion handeln, die im Falle einer Schwangerschaft der Therapie bedarf. Detaillierte Zusammenhänge über die Beurteilung des Toxoplasmose-Immunfluoreszenztestes in der Schwangerschaft sollen an dieser Stelle nicht näher beschrieben werden, es wird auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen:

Piekarski, G. und Finger, H. (1974); Aspöck, H. (1976); Roser, H. (1976); Werner, H., Bundesgesundheitsblatt, 18, (1975); Braveny, I. und Disko, R. (1976); Dahm, H. (1975); Kräubig, H. (1976); Robertson, P. W. und Kertesz, V. (1975), Merkblatt Nr. 20 des DÄV (1973); Remington, J. S. (1969), Remington, J. S. und Desmonts, G. (1973), Tympner, K.-D. (1971).

Das oben wiedergegebene Interpretationsschema nach Piekarski, G. und Finger, H. (1974) besitzt keine absolute Gültigkeit; für andere Forschergruppen hat sich eine in Titerstufen modifizierte Beurteilung bewährt, Roser, H. (1976); Braveny, I. und Disko, R. (1976); Werner, H. Bundesgesundheitsblatt, 18, (1975).
Allgemein gilt, daß serologische Befunde nur im Zusammenhang mit der klinischen Symptomatik interpretiert werden können, die angebotenen Interpretationsschemata stellen in Verbindung mit dem klinischen Bild Entscheidungshilfen dar, Piekarski, G. und Finger, H. (1974); Aspöck, H. (1976).

4.3.2. Pneumocystitis carinii

Der Pneumocystis carinii (weiterhin, P.c.) wurde in den Jahren 1909 bis 1911 in Brasilien von C. Chargas und C. Carini sozusagen als „Nebenbefund" bei der Chargas-Krankheit beschrieben, nach Robbins, J. B. und Mitarb. (1976); Iváďý, G. (1976) - und erhielt seinen Namen von dem Ehepaar Delanoë, Paris, 1919 (Rattenbefunde).
Auf seine Verbindung mit der interstitiellen plasmacellulären Pneumonie wiesen später verschiedene Autoren hin, Literatur bei Iváďý, G. (1976). Heute werden 2 Formen der P.c.-Infektion unterschieden, Iváďý, G. (1976); Kohout, E. und Mitarb. (1972). Die erste Form kommt bei Frühgeborenen und atrophischen Säuglingen vorwiegend zwischen dem 2. und 6. Lebensmonat vor, besonders zur Zeit der physiologischen Hypogammaglobulinämie um den 3. Lebensmonat, Iváďý, G. (1976). Die andere Form der interstitiellen plasmacellulären Pneumonie (weiterhin i.P.) tritt hingegen meist bei älteren Säuglingen, Kindern und Erwachsenen während einer Immundefizienz oder eines hypoergischen Zustandes ein, Iváďý, G. (1976).

Dieser hypoergische Zustand kann angeboren, erworben oder iatrogen sein: Hypo- und Agammaglobulinämie, die sich an eine andere Krankheit, wie beispielsweise Cytomegalie, kongenitale Rubeola anschließen kann - aber auch eine Reihe anderer Virus- und Pilzinfektionen wurden in diesem Zusammenhang beschrieben - ; ferner Immundefizienz bei Wiskott-Aldrich-Syndrom; Thymusaplasie; durch Medikamente oder Strahlen verursachter Hypoimmunzustand bei Transplantationen, während der zytostatischen Therapie maligner Erkrankungen; bei der Langzeitbehandlung mit Corticosteroiden, Ivády, G. (1976), mit detaillierter Literaturangabe; ferner: Riechers, F. (1970); Jehn, U. (1977); Goetz, O. und Peller, P. (1974); Redman, J. C. (1974); Burke, B. A. und Good, R. A. (1973); Goodell, B. und Mitarb. (1970), Esterly, J. A. und Warner, N. E. (1965); Johnson, H. D. und Johnson, W. W. (1970). Daher haben in den letzten Jahren i.P. infolge einer immer häufiger angewandten immunsuppressiven oder zytostatischen Therapie zugenommen, Goetz, O. und Peller,P.(1974). Allerdings scheinen nach Jehn, U. (1977) Zytostatika nur bei gleichzeitiger Gabe von Corticosteroiden diese Pneumonie zu begünstigen.
In der BRD liegen Berichte über Fälle bei Kindern und Erwachsenen vor, Goetz, O. und Peller, P. (1974). Weitere Veröffentlichungen dieser Art kommen nach Goetz, O. und Peller, P. (1974) aus der Schweiz, Norwegen und aus den USA. Zusammenfassend ist zu sagen, daß für das Entstehen einer i.P. nicht einzelne Faktoren allein, sondern ein Summationseffekt verantwortlich gemacht werden muß, Riechers, F. (1970). Sicherlich spielen Corticosteroide dabei eine maßgebliche Rolle, aber auch die genannten Faktoren, wie z.B. Röntgenbestrahlung, Infektionskrankheiten, Infekte, maligne Erkrankungen - unabhängig davon, ob eine Störung der humoralen und/oder der zellulären Immunabwehr vorliegt oder nicht, Jehn, U. (1977) - dürften von Bedeutung sein, Riechers, F. (1970).
P.c. ist wahrscheinlich ein Protozoon, dessen taxonomische Klassifikation jedoch unsicher ist, denn es gelang bisher nicht, die Pneumozysten in der Kultur zu züchten und damit hinreichende funktionelle, mikrobiologische Parameter aufzustellen, Jehn, U. (1977). Nach Goetz, O. und Peller, P. (1974) und Weller, R. (1955) gelang es zwar, bei Ratten durch Cortisonbehandlung eine

der i.P. des Säuglings ähnliche Lungenerkrankung hervorzurufen, allerdings unterscheiden sich die Rattenpneumozysten serologisch von den humanen, so daß man nach Goetz, O. und Peller, P. (1974) auch heute noch für die Antigengewinnung auf Lungen von Patienten angewiesen ist, die an einer Pneumocystis carinii-Pneumonie verstorben sind. Auch Robbins, J. B. und Mitarb. (1976) halten die Pneumocystose der Ratte nicht für identisch mit der des Menschen; daher wird neben der Bezeichnung Pneumocystis carinii (Ratte) auch der Name Pneumocystis jiroveci (Mensch) verwendet.
Untersuchungen beim Menschen wie auch beim Tier zeigen, daß P.c. auf der ganzen Welt verbreitet ist; Goetz, O. und Peller, P. (1974) und wie oben erwähnt, sind die Pneumozysten unter normalen Bedingungen apathogen, virulent sind sie nur für einen in seiner Resistenz geschwächten Organismus, Goetz, O. und Peller, P. (1974), u.a.; siehe Literaturangabe oben.
Säuglinge oder Kinder, die an einer i.P. erkranken, bilden so gut wie immer Antikörper, die mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (KBR) erfaßt werden können, Goetz, O. und Peller, P. (1974). An der Spezifität der entstehenden Antikörper ist heute nicht mehr zu zweifeln, Goetz, O. und Peller, P. (1974).
Goetz, O. (1965) weist mit der Fluoreszenz-Antikörpertechnik nach, daß die bei der i.P. auftretenden Antikörper durch P.c. hervorgerufen werden. Mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztestes weist Goetz, O. (1965) ferner nach, daß die vom Kind gebildeten Antikörper in vivo an die Pneumozysten angelagert sind. Die gebildeten Antikörper treten im akuten Stadium der Erkrankung auf und sind einige Monate nach Ablauf der Infektion nicht mehr faßbar, Goetz, O. und Peller, P. (1974)
Kučera, K. und Kramář, J, (1968) beschreiben zum Nachweis von Pneumocystis-Antikörper oder von Pneumozysten im Gewebe die Methode der Komplementfluoreszenzfärbung, „C- Färbung". Als Antigen benutzen die Autoren histologische Schnitte aus Lungen von Albinoratten mit Experimentalpneumozystose, die durch eine Modifikation des Verfahrens nach Weller, R. (1955) hervorgerufen wird. Das Antigen wird in einem Gemisch von 19 Vo. absol. Alkohol und 1 Vol. Eisessigsäure fixiert und in Esterwachs Gurr eingebettet

wo es seine immunologische Aktivität einige Monate lang behält, Kučera, K. und Kramář, J. (1968) mit spezieller Literaturangabe. Immunseren gegen Pneumocystis von Kaninchen werden nach Kučera, K. und Kramář, J. (1968) einerseits mit Hilfe von Pneumozysten aus menschlichen Lungen, andererseits mit Hilfe von Pneumozysten aus Lungen von Albinoratten mit künstlich verursachter Pneumozystose gewonnen.

Das Komplement wird für jeden Versuch aus frisch entnommenen Seren von Meerschweinchenmännchen gewonnen, die mit dem Pneumocystis-Antigen in der KBR und in der indirekten Immunfluoreszenzreaktion nicht reagieren. Als weitere Komplementquelle bewährt sich nach Kučera, K. und Kramář, J. (1968) frisches Menschenserum mit negativen Reaktionen auf Pneumocystis-Antikörper.

Kučera, K. und Kramář, J. (1968) benutzen das markierte kommerzielle FITC-Schweineglobulin gegen Meerschweinchen oder Human-Gammaglobulin. Die Konjugate werden mit Hilfe des Pulvers aus Lungen der Kaninchen absorbiert.

Durchführung der Reaktion und Reaktionsbewertung siehe bei Kučera, K. und Kramář, J. (1968). Die Anwendung der sog. „C-Färbung" zeigt sich nach den Autoren als eine ebenso geeignete Reaktion sowohl zur Identifizierung von Pneumozysten im Gewebe als auch zum Nachweis von Antikörpern gegen Pneumozysten im Serum wie die indirekte Immunfluoreszenzreaktion. Mit Hilfe ihres Nachweisverfahrens gelingt Kučera, K. und Kramář, J. (1968) die Identifizierung von Pneumozysten in Lungen verschiedener Tierarten mit nur einem einzigen Antimeerschweinchen- bzw. Antihumankonjugat, - im Rahmen der Protozoologie nach den Autoren eine bedeutende Tatsache.

Die indirekte Immunfluoreszenzreaktion zum Nachweis von Antikörpern gegen P.c. wurde zum ersten Male von polnischen Autoren beschrieben, Literatur bei Kučera, K. und Kramář, J. (1968). Goetz, O. (1965) verwendet dieselbe Methode zum Nachweis der Spezifität der auftretenden Antikörper bei der i.P. Für seine Untersuchungen benutzt Goetz, O. (1965) Lungen von Kindern, die an einer i.P. verstorben waren. Die Seren der Kinder weisen

einen positiven Titer in der KBR auf; die Lungentupfpräparate und das histologische Bild ergeben den bekannten Befund einer i.P., in den Alveolen findet sich massenhaft P.c., Goetz, O. (1965). Von diesen Lungen fertigt Goetz, O. (1965) Gefrierschnitte an, die in Aceton fixiert werden. Als antikörperhaltige Seren benutzt Goetz, O. (1965) Seren von erkrankten Säuglingen, die in der KBR einen Titer von über 1:128 ergeben. Als negative Seren dienen dem Autor Seren von Erwachsenen, die in der KBR negativ reagieren. Die Lungenschnitte, die P.c. in großer Anzahl enthalten, werden mit den positiven Antiseren überschichtet. Nach dem Waschen erfolgt die Zugabe des mit Fluoreszein konjugierten Antihuman-Gammaglobulin. Als Kontrollen läßt Goetz, O. (1965) Lungenschnitte in der Untersuchung mitlaufen, die mit negativen Seren, sowie mit Kochsalz statt Serum und schließlich mit Anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin statt mit Antihuman-Gammaglobulinkonjugat überschichtet werden.
Goetz, O. (1965) erhält folgende Befunde:
Starke Fluoreszenz weisen die Schnitte mit positiven Antiseren auf, schwächere Fluoreszenz die Schnitte mit negativem Serum und mit Kochsalz, keine Fluoreszenz die Schnitte mit Anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin. Bei allen Fluoreszenzbildern fehlt eine intrazelluläre Fluoreszenz, eine intrazelluläre Lagerung des Erregers ist nach Goetz, O. (1965) damit sehr unwahrscheinlich.
Bommer (Marburg/Lahn) weist in der Aussprache über die Untersuchungen von Goetz, O. (1965) darauf hin, daß die Fluoreszenzfärbung von Pneumozysten im Lungenausstrichpräparat sehr leicht mit Auramin 1:1000 gelingt. Die Innenkörperchen der reifen Cysten stellen sich nach Bommer (Marburg/Lahn) mit goldgelber Fluoreszenz dar, die Wandung bleibt ungefärbt. Auch Kerne von Einzelformen können erkannt werden. Auramin ist ein basischer Diphenylmethan-Farbstoff, der bis gegen pH 9 dissoziert und nach Elektroadsorption des Kations eine goldgelbe Fluoreszenz ergibt, Bommer (Marburg/Lahn, 1965).
Bommer(Marburg/Lahn, 1965) berichtet ferner, daß sich einzelne Pneumozystenstadien im Paraffinschnitt der Lunge mit Rhodamin B

in leuchtend gelber oder orangener Färbung zur Darstellung bringen lassen. Die Färbung ist bei einem pH von unter 0,8 für Pneumozysten selektiv wie nach Bommer (Marburg/Lahn, 1965) die Autoren Opferkuch und Ricken bereits an Rattenpneumozysten zeigen konnten. Auffällig ist nach Bommer (Marburg/Lahn, 1965), daß nur einzelne Entwicklungsstadien der Pneumozysten dargestellt werden, während die Masse der Parasiten in den Alveolen ungefärbt bleibt. Ein ähnliches Verhalten zeigt nach Bommer (Marburg/Lahn, 1965) auch die Giemsa-Färbung, bei der offenbar dieselben Cystenstadien grampositiv erscheinen, die durch eine Rhodamin B-Fluorochromierung angefärbt werden. Rhodamin B ist ebenfalls ein basischer Farbstoff (Xanthenfarbstoff), der im pH-Bereich von 2 bis 11,5 als undissoziiertes Molekül vorliegt und ein elektronenneutrales Verhalten zeigt, Bommer (Marburg / Lahn, 1965). Rhodamin B gilt unter diesen Bedingungen als Lipoidfarbstoff, wobei das ganze Molekül gespeichert wird, Bommer (Marburg/Lahn, 1965). Bei einem pH unter 1 jedoch, wie es von Bommer und Mitarb. (Marburg/Lahn, 1965) bei der Fluorochromierung von Pneumozysten angewendet wurde, ist Rhodamin B mit Sicherheit dissoziiert, und es gelten die Gesetze der elektrostatischen Absorption, Bommer (Marburg/Lahn, 1965). Nach Bommer (Marburg/Lahn, 1965) kann über die chemische Natur der durch Rhodamin B in diesem pH-Bereich angefärbten Substanzen noch keine nähere Aussage gemacht werden.
Nach Goetz, O. (1965) stellt die indirekte Fluoreszenzmethode das wesentlich sensiblere Nachweisverfahren dar als der direkte Fluoreszenztest. Goetz, O. (1965) erhält bei Anwendung der direkten Methode eine weniger intensive Fluoreszenz als bei der indirekten Methode. Der Autor kann mit Hilfe der direkten Immunfluoreszenz zeigen, daß die vom Kinde gebildeten Antikörper sich in vivo an die Pneumozysten anlagern.
Lim, S. K. und Mitarb. (1974) wenden die direkte Fluoreszenzmethode an, um im Sputum oder Trachealaspirat P.c. nachzuweisen. Bereits in früheren Untersuchungen, Lim, S. K. und Mitarb. (1973) konnte mit dem direkten Fluoreszenzverfahren in Hypopharynx-Abstrichen P.c. nachgewiesen werden, und zwar bei Ratten mit Cortison-induzierter i.P.

Lim, S. K. und Mitarb. (1974) erhalten die Sputumproben meist von Patienten, die unter immunsuppressiver Therapie stehen und bei denen radiologisch und klinisch die i.P. dokumentiert werden kann. Die Sputumproben und Trachea-Aspirate werden mit mukolytischen Reagenzien behandelt:frisch angesetzte N-acetyl-L Cystein- (NALC-) Lösung bis zur Endkonzentration von 0,25 - 0,3 %. Nach Mukolysis, 10 bis 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließend, um eine Endkonzentration von 1 % zu erhalten, Zugabe von 1/N NaOH-trisodium-acetat, - ein Verfahren, das von Dye, W. E. und Kubica, G. P. (1970) beim Nachweis von Mykobacterium tuberculosis beschrieben wurde. Es folgt zweimaliges Zentrifugieren; das Sediment stellt damit ein konzentriertes Untersuchungsmaterial dar.
Die Hypopharynx-Abstriche werden nach Lim, S.K. und Mitarb. (1974) entweder direkt auf Objektträger aufgetragen oder nach 15 bis 20 minütiger Behandlung mit NALC (pH 8) zentrifugiert, Sheffner, A.L. und Mitarb. (1964). Gleichzeitig werden von dem Salz-gewaschenen Sediment Untersuchungsproben für die mikroskopische Kontrolle vorbereitet, (Methenamin-Siber-Färbung).
Die weitere Behandlung der Proben, die fluoreszenzserologisch (direkte Methode) untersucht werden sollen wird von Lim, S. K. und Mitarb. (1974) folgendermaßen durchgeführt (in einer früheren Arbeit ausführlich beschrieben: Lim, S. K. und Mitarb. (1973):
Die gefärbten Anti-P.c.-Antikörper, menschlicher oder tierischer Herkunft - werden den auf Objektträgern ausgestrichenen Untersuchungsproben zugesetzt und bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Anschließend zweimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, phosphate buffered saline, pH 7,6) für jeweils 10 min. Gegenfärbung mit Erichrom-Schwarz (1:20 verdünnt) für 5 sec und Fixieren mit gepuffertem Glycerin. Die Kontrollproben werden auf dieselbe Weise vorbereitet.
Mit Hilfe des indirekten Immunfluoreszenztestes kontrollieren Lim, S. K. und Mitarb. (1974) bei positivem direkten Immunfluoreszenztest Verlauf der Antikörpertiter. Für diesen indirekten Immunfluoreszenztest benutzen die Autoren Rattenabstriche mit

P.c., die sie der zweifachen Verdünnung des Testserums zusetzen und inkubieren.
Nach zweimaligem Waschen mit PBS, pH 7,6, für je 10 min werden die Ausstriche der Untersuchungsproben entweder mit Antihuman-Immunglobulin (IgG, Verdünnung 1:5) oder mit Antihuman-Gammaglobulin, Verdünnung 1:30, bei Raumtemperatur für 45 min inkubiert. Gegenfärbung und Auswertung erfolgen nach den üblichen Kriterien.
In der Studie von Lim, S. K. und Mitarb. (1974) zeigt sich bei den Patienten, bei denen mittels des direkten Immunfluoreszenztestes P.c. nachgewiesen wird, eine Korrelation von Antikörpertiter und Dauer der Infektion: in der akuten Krankheitsphase stellen Lim, S. K. und Mitarb. (1974) mittels des indirekten Immunfluoreszenztestes niedrige Antikörpertiter fest; während Seren, die 2 bis 4 Wochen nach immunsuppressiver Therapie abgenommen wurden, mäßige bis hohe Antikörpertiter aufweisen.
Kreuzreaktionen mit anderen Organismen, besonders mit Hefen des oberen Respirationstrakts bringen nach Lim, S. K. und Mitarb. (1974) keine Schwierigkeiten beim Fluoreszenznachweis von P.c.
Allgemein kann gesagt werden, daß die Ergebnisse der Untersuchungen von Lim, S. K. und Mitarb. (1974) beweisen, - im Gegensatz zu den entsprechenden Befunden von Goetz, O. (1965) -, daß der direkte Immunfluoreszenztest eine empfindliche und zuverlässige Nachweismethode einer i.P. ist und eine wertvolle Hilfe bei der Diagnose einer frühen und inapparenten Infektion, Lim, S. K. und Mitarb. (1974).

4.3.3. Treponema pallidum

Das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz wurde nach Zajac, W. und Mitarb. (1969) im Jahre 1957 von Deacon, W. E. und Mitarb. in der Syphilisdiagnostik angewandt. Im Laufe der Jahre wurden die Methoden der Luesdiagnostik weiterentwickelt, wobei der indirekte Immunfluoreszenztest heute einen festen Platz in der serologischen Diagnostik erlangt hat. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, treponemenspezifische Antikörper an abgetötete Treponema pallida zu binden und diese Bindung durch Anlagerung eines fluoreszenzmarkierten Antihumanglobulinserums im UV-Mikroskop sichtbar zu machen. Die Möglichkeit unspezifische Reaktionen durch Vorhandensein gruppenspezifischer Antikörper gegen apathogene Treponemen wird durch eine Vorabsorption des Patientenserums mit Treponema phagedenes (Reiter Treponemen) vermieden, Roser, H. (1976).
Von der Industrie werden sog. Kits angeboten, in denen alle für den Reaktionsablauf erforderlichen Reagenzien enthalten sind. In der Lues-Diagnostik können der Fluoreszenz-Treponema-Antikörper-Absorptions- (weiterhin: FTA-ABS-) Test und der FTA-200-Test benutzt werden (beispielsweise: Fluoro-Kit-Test, Bezugsquelle: Fa. Hyland-Travenol, Landwehrstr. 64 a, 8000 München 1; Reagenzien für die Lues-Diagnostik, Behringwerke, 6230 Frankfurt (M) 80).
Die Reagenzien für den FTA-ABS-Test müssen dem Bundesamt angemeldet werden, eine staatliche Chargenprüfung findet zur Zeit noch nicht statt, Müller, F. (1977). Daher können gelegentlich infolge unzureichender Reagenzien biologisch unspezifisch reaktive Ergebnisse festgestellt werden, Müller, F. (1976 und 1977).
Trotzdem bieten diese Kits für den Routinebetrieb in der Fluoreszenztechnik wirtschaftliche Vorteile, die an anderer Stelle erörtert werden.
Die serologische Frühdiagnose der Syphilis hat den Nachweis jener humoralen Antikörper zum Ziel, die als erste im Verlauf der Immunabwehr auftreten. Es handelt sich um großmolekulare Globuline von IgM - (19 S-) Typ, die in der Syphilis-Diagnostik

mit Hilfe des IgM-FTA-ABS-Testes dargestellt werden, Müller, F. (1977). Im Vergleich zum normalen FTA-ABS-Test werden mit dieser Reaktion die schweren (μ) Ketten der IgM- (19 S-) Antikörper und damit diese selbst selektiv fluoreszenzimmunologisch nachgewiesen, Müller, F. (1977). Nach Müller, F. (1977) lassen sich beinahe regelmäßig bei der Frühsyphilis und im Stadium der Frühlatenz mit dem IgM-FTA-Test in den Patientenseren treponemaspezifische IgM (19 S-) Antikörper darstellen. Allerdings ist der Test mit der üblichen Methodik bei der angeborenen Syphilis gelegentlich nur schwach oder gar nicht reaktiv; ebenso im Stadium der Spätlatenz findet man die treponemenspezifischen IgM-(19 S-) Antikörper im Vollserum nur ausnahmsweise, Müller, F. (1977). Die gleichzeitig im Patientenserum vorhandenen, kleinmolekularen IgG- (7 S-) Antikörper haben nach Müller, F. (1977) eine größere Affinität zum Testantigen, dadurch können bei hohen Titern treponemspezifischer IgG-Antikörper die Antikörper vom IgM-Typ vom Antigen verdrängt werden, Müller, F. (1977); Atwood, W. G. und Miller, J. L. (1969).
Diese Hypothese konnte für den IgM-FTA-ABS-Test experimentell belegt werden, Müller, F. (1977).
Eine derartige Antikörperkonstellation erfordert nach Müller, F. (1977) die Gelfiltration des Serums über Sephadex G 200 oder im Succrose-Gradienten der Ultrazentrifuge, um die IgG- von den IgM-Antikörpern abzutrennen. Anschließend muß man mit Hilfe der Immunfluoreszenz im 19 S- Elutionsmaximum gezielt nach treponemspezifischen IgM-Antikörpern forschen, Müller, F. (1977). Auf weitere Koordination immunologischer Befunde mit der Klinik der Syphilis soll nicht näher eingegangen werden. Man ist versucht zu sagen, daß in der Syphilisdiagnostik ein Stadium erreicht ist, in dem entscheidende Verbesserungen nicht mehr zu erwarten sind, Müller, F. (1976 und 1977). Dies stimmt nicht ganz: in wissenschaftlicher Erprobung sind zur Zeit der Enzyme Linked Immuno Sobent Assay (ELISA) und die Bindung von Treponema-Teilantigen (nach deren Reinigung) an Latexpartikel zu einer weiteren Verbesserung der Spezifität gegenüber dem Treponema-pallidum-Hämagglutinations- (TPHA-) Test.

Aus der überwältigenden Fülle der Literatur wird zum Abschluß versucht, einen Überblick über die Publikationen über die verschiedenen Modifikationen des FTA-Testes, über seine Spezifität und über seine Aussagefähigkeit im Vergleich zum Treponema-pallidum-Immobilisations- (TPI-) Test oder Nelson-Test zu geben, - ohne Anspruch auf Vollständigkeit.

1. Über die verschiedenen Modifikationen des FTA-Testes berichten: u.a.: Deacon, W. E. und Mitarb. (1957); Hunter, E. F. und Mitarb. (1964); Meyer-Rohn, J. (1964); Petzold, D. (1964); Fromm, G. (1965); Petzold, D. und Tupath-Barniske, R. (1965); Roser, H. (1976); Palm, G. (1970); Müller, F. (1977); Leyh, F. (1974); Luger, A. (1972); Müller, F. und Loa, P. L. (1974); Poetschke, G. und Gregorczyk, K. (1975); Zajac, W. und Mitarb. (1969).

2. Über die Spezifität des FTA-Testes berichten u.a.: Poetschke, G. und Killisch, L. (1959); Deacon, W. E. und Hunter, E. F. (1962); Hunter, E. F. und Mitarb. (1964); Bredt, W. (1965) Gregorczyk, K. (1966); Schierz, G. und Meigel, W. (1968); Palm, G. (1970); Roser, H. (1976); Remy, B. und Mitarb. (1976); Poetschke, G. und Gregorczyk, K. (1975); Fegeler, K und Fegeler, F. (1976); Meyer-Rohn, J. (1973 und 1974); Kraft, D. und Mitarb. (1973); Borkhardt, H.-L. (1973); Petzold, D. (1964); Müller, F. (1976 und 1977); Elste, G. und Mitarb. (1969).

3. Über die Aussagefähigkeit des FTA-Testes im Vergleich mit dem TPI-Test berichten u.a.: Fife, E. H. und Mitarb. (1961); Deacon, W. E. und Mitarb. (1966); Gregorczyk, K. (1966); Knox, M. J. und Mitarb. (1966); Meyer, P. E. und Hunter, F. E. (1967); Borkhardt, H.-L. (1973); Kraft, D. und Mitarb. (1973); Meyer-Rohn, J. (1973); Gillert, K. E. (1975); Elste, G. und Mitarb. (1969); Müller, F. (1977).

4.4. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Mykologie

In der Serologie der Mykosen hat die indirekte Immunfluoreszenz-Reaktion bisher keine breitere Anwendung gefunden, Bienias, L. (1971). Das ist wohl auch durch die Tatsache bedingt, daß Fäden und Sporen vieler Pilze eine Autofluoreszenz besitzten, wodurch die Beurteilung der Reaktionsergebnisse erheblich erschwert ist, Bienias, L. (1971). Trotzdem sind in der Mykologie Immunfluoreszenzverfahren bei manchen schwierigen Problemen durchaus mit Gewinn anzuwenden. So ist etwa Sporotrichum Schenkii leicht und spezifisch nachzuweisen, Kaplan, W. und Ivens, M. S. (1960); Diem, E. (1973), während eine immunfluoreszenzserologische Typisierung der verschiedenen Candida-Arten durch zahlreiche Kreuzreaktionen aufwendig und schwierig ist, Diem, E. (1973). Zirkulierende Candida-Antikörper sind zwar grundsätzlich fluoreszenzserologisch nachweisbar, doch ist dies klinisch wenig bedeutsam, Diem, E. (1973); ausgenommen vielleicht bei der Candidosis der inneren Organe, hier kann die Immunfluoreszenzreaktion eine Rolle in der Diagnostik spielen, Kaben, U. und Heise, H. (1973); Bienias, L. (1971). So beschreiben Kaben, U. und Heise, H. (1973) die Anwendung der indirekten Immunfluoreszenztechnik bei der Diagnose von Hefemykosen im Vergleich zur Agglutinationsreaktion. Die Untersuchungen zeigen, daß die Immunfluoreszenz und auch die Agglutination lediglich als zusätzliche Methoden bei der Diagnostik von Candidosen genutzt werden sollten, ihre Aussagekraft reicht nicht aus, um allein damit die Diagnose zu stellen, Kaben, U. und Heise, H. (1973). Insbesondere für die Diagnostik von Candidosen innerer Organe sollten nach Kaben, U. und Heise, H. (1973) neben den beiden genannten Methoden weitere serologische Untersuchungen herangezogen werden. Zu der gleichen Aussage kommt auch Böhme, H. (1973), die über ihre Erfahrungen mit der Immunfluoreszenzreaktion bei Candidiasis berichtet. Weitere Literatur über Anwendung und Bedeutung der indirekten Immunfluoreszenztechnik bei der Diagnose von Hefemykosen bei: Bienias, L. (1971); Böhme, H. (1973).

5. Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Immunpathologie

5.1. Nachweis von Autoantikörpern

Die Anwendung der Immunfluoreszenz in der Immunpathologie ist vielseitig; sie umfaßt u. a. die Diagnostik von Autoimmunkrankheiten, die Lokalisation von Immunkomplexen im Gewebe, u.a. Helmke, K. und Mitarb. (1976); Rother, K. und Sarre, H. J. (1961); Roit, I. M. (1977), die Analyse von Zelloberflächenantigenen (beispielsweise in der Tumor- und Transplantationsimmunologie , Noltenius, H. (1977); Knapp, W. (1977)), den Nachweis von Hormonen, Wick, G. und Mitarb. (1976), oder anderen Proteinen in Organschnitten, Untersuchungen auf dem Gebiet der Allerlogie (beispielsweise Nachweis von IgE auf basophilen Granulozyten und Mastzellen, Marmont, A. M. und Mitarb, (1975)), die Erforschung metabolischer Vorgänge (z. B. Darstellung der Zwischenstufen des Catecholaminabbaues , Wick, G. und Mitarb. (1976)), oder der Kollagensynthese, Müller, P. K. und Mitarb. (1977); Beutler, E. und Baluda, M. C. (1966); Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975) und verschiedene andere Anwendungsgebiete.

Das Anwendungsspektrum des Immunfluoreszenztestes in dieser medizinischen Fachrichtung ist damit nur angedeutet. Im Rahmen dieser Arbeit soll auf bestimmte, besonders in der Pädiatrie relevante Problemkomplexe eingegangen werden.

Große Beduetung haben die Autoimmunkrankheiten, für deren Differenzierung und damit deren diagnostischer Aussagekraft die Immunfluoreszenztechnik eine unentbehrliche Standardmethode geworden ist.

Eine Übersicht über die bei inneren Krankheiten immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Autoantikörper gegen verschiedene Organ- oder Gewebskomponenten bietet Tabelle 4.:

Antikörper gegen Zellkernsubstanzen	Ak-Frequenz
Kollagenosen	
Lupus erythematosus	100 %*
Sklerodermie	40-80 %
Dermatomyositis	20-30 %
PcP	30 %
Periarteriitis nodosa	30 %
Sjögren Syndrom	70 %
chron. aggressive Hepatitis	30-50 %
primär biliäre Zirrhose	30-40 %
kryptogene Zirrhose	30 %
bestimmte Medikamente	**
Gesunde (unter 40 Jahren)	5 %
Gesunde (über 60 Jahren)	10-20 %

Antikörper gegen Mitochondrien	
Lebererkrankungen	
prim. biliäre Zirrhose	95* %
chron. aggressive Hepatitis	30 %
kryptogene Zirrhose	30 %
Gesunde	0 %

Antikörper gegen Antigene der Muskulatur	
a) Herzmuskulatur	
rheumatische Karditis (klin.aktiv)	30-80 %
Myokardiopathie	10-20 %
nach Herzoperationen	60-90 %
Gesunde	< 3 %
b) Quergestreifte Muskulatur	
Myasthenia gravis	30-45 %
Myasthenia gravis und Thymom	50-90 %
Gesunde	0 %
c) Glatte Muskulatur	
chron. aggressive Hepatitis	60 %
prim. biliäre Zirrhose	30 %
kryptogene Zirrhose	30 %
Gesunde	2 %

Antikörper gegen Antigene der Nebenierenrinde

M. Addison (idiopathisch)	50 %
andere Autoimmunerkrankungen	2 %
Gesunde	0 %

Antikörper gegen mikrosomale Schilddrüsenantigene

Schilddrüsenerkrankungen	
Hashimoto Thyreoiditis	90* %
Thyreotoxikose	50 %
primäres Myxödem	40-60 %
Schilddrüsen-Karzinom	20 %
M. Addison	30-40 %
perniciöse Anämie	45 %
Gesunde (besonders ältere Personen, ♀<♂)	2-20 %

Antikörper gegen Parietalzellen

perniciöse Anämie	80-90 %
atrophische Gastritis	60 %
Schilddrüsenerkrankungen	20-30 %
M. Addison	30 %
Gesunde (besonders ältere Personen, ♀<♂)	5-15 %

* Ein positiver Antikörperbefund ist für diese Erkrankung pathognomonisch.

** Antikörperfrequenz ist anhängig von der Art des Medikaments, Dauer der Einnahme und Dosis sowie von Alter und Disposition des Patienten.

Tab. 4: Übersicht über die bei inneren Erkrankungen immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbaren Autoantikörper sowie deren Häufigkeit.
Nach Ludwig, H. und Knapp, W. (1974).

Erwähnt seien noch die LKM- (liver, kidney, microsomal) Antikörper, nachweisbar bei einem Teil der Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis, aber auch bei Patienten mit einigen anderen Erkrankungen, Ludwig, H. und Knapp, W. (1974); ferner soll auf die immunfluoreszenzmikroskopisch erfolgte Beobachtung von zwei verschiedenen Antikörpertypen bei akuter und chronischer Pankreatitis hingewiesen werden, Ludwig, H. und Knapp, W. (1974).
Durch einen positiven Autoantikörperbefund kann ein wichtiger Hinweis auf das Vorliegen einer bestimmten Krankheit gegeben sein, ja, der positive Befund selbst kann sogar pathognomonische Bedeutung besitzen, (siehe in der Tabelle 4 die Antikörperfrequenz, Ludwig, H. und Knapp, W. (1974)). In geringer Anzahl können allerdings auch bei klinisch gesunden Personen Autoantikörper nachgewiesen werden; ferner soll in Betracht gezogen werden, daß die Häufigkeit vieler Autoantikörper wie auch Autoimmunerkrankungen mit steigendem Alter scheinbar in dem Maße zunimmt, wie die Fähigkeit des immunkompetenten Systems zwischen fremden und eigenen Antigenen zu unterscheiden abnimmt, Ludwig, H. und Knapp, W. (1974).

5.1.1. Antinukleäre Faktoren

Antikörper gegen Zellkernbestandteile (antinukleäre Faktoren, weiterhin: ANF) lassen sich bei mehrerer Autoimmunkrankheiten nachweisen. Es handelt sich um ein breites Spektrum verschiedener Kernantigene, gegen die antinukleäre Antikörper gebildet werden.

1. Desoxyribonukleinsäure	(DNS)
Native Desoxyribonukleinsäure	(nDNS)
Denaturierte Desoxyribonukleinsäure	(dDNS)
Einstrangige Desoxyribonukleinsäure	(sDNS)
2. Ribonukleinsäure	(RNS)
3. Nukleoprotein	
4. Histon	
5. Extrahierbare nukleäre Antigene	(ENA)
Mit nukleäre RNS	
Ohne nukleäre RNS	

Tab. 5: Zielobjekte antinukleärer Faktoren, nach Hoppe, J. (1977).

Im allgemeinen treten bei ANF-positiven Erkrankungen Autoantikörper nicht nur gegen ein, sondern gegen mehrere Kernbestandteile in Erscheinung, man spricht von antinukleären Autoantikörpergemischen, Hoppe, I. (1977). Für Screeninguntersuchungen genügt der globale Nachweis, und dafür stehen unterschiedliche Untersuchungsmethoden zur Verfügung:

1. LE-Zell-Phänomen
2. Agglutinationstechnik
   Latex-Test
   Bentonit-Test
   Passiver Hämagglutinationstest
3. Komplementbindungsreaktion
4. Antiglobulin-Verbrauchstest
5. Indirekter Immunfluoreszenztest
6. Radioimmunassay

Tab. 6: Methoden zum Nachweis von antinukleären Faktoren, nach Hoppe, I. (1977).

Die indirekte Immunfluoreszenztechnik ist heute in den meisten Labors der bevorzugte ANF-Globaltest, Hoppe, I. (1977), Kalden, J. R. (1975); Müller, W. (1975); Zabel, H. (1969), Asamer, H. (1968 Als Antigen werden vorwiegend Kryostatschnitte von Rattenleber verwendet, beinahe ebensogut können aber auch Zellkerne anderer Organe oder Hühnererythrozyten sowie menschliche Granulozyten zum immunfluoreszenzmikroskopischen Nachweis von ANF dienen, Hoppe, I. (1977); Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965); Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970); Häntzschel, H. und Mitarb. (1976); Scherer, R. (1976).
Als sensible und spezifische Methode hat sich die von Friou, G. J. (1958) erstmals verwendete indirekte Fluoreszenz-Antiglobulintechnik durchgesetzt, Mueller-Eckhardt, Ch. und Mitarb. (1968); Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970). Die angewandte Methodik entspricht der von Coons, H. H. (1954) entwickelten Fluoreszenz-Antikörpertechnik. Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) gehen dabei folgendermaßen vor:

Aus Patientenseren wird mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung die Globulinfraktion ausgefällt, mit physiologischer NaCL-Lösung wieder in Lösung gebracht und zur Entfernung des Ammoniumsulfat über Nacht dialysiert (Dialysierlösung, nach Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970): Phosphatgepufferte, physiologische NaCL-Lösung, pH 7,2). Die Globulin-angereicherten Seren können nach Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) bei -20° C mehrere Monate lang aufbewahrt werden.
Die Autoren benutzen bei dem Immunfluoreszenztest für ANF Mäuseleberschnitte. Die Leber wird sofort nach Tötung der Tiere entnommen, mit Kohlensäureschnee tief gefroren und im Kryostaten mit einer Dicke von 8-10 µ geschnitten; (Mueller-Eckhardt, Ch. und Mitarb. (1968) verwenden 7 µ dicke Gefrierschnitte frischer Rattenleber, die auf Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet werden). Die Gefrierschnitte sind nach Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) für die AFN-Darstellung deshalb gut geeignet, weil bei dieser Technik die Kernstruktur erhalten bleibt und daher die Kernreaktion gut zu beurteilen ist. Nach Fixierung in wasserfreiem Aceton (10 min) und nachfolgender Spülung in gepufferter, physiologischer NaCL-Lösung, pH 7,2,werden die Schnitte mit dem zu untersuchenden Serum bei Zimmertemperatur in einer feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Danach werden nach Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) die Präparate in dreimal erneuerter Phosphatpufferlösung pH 7,2 10 min lang unter vorsichtigem Schwenken gespült. Nach dem Spülen werden die Präparate im Luftstrom getrocknet und anschließend jedes Präparat für 30 min mit fluoreszenzkonjugiertem Antihumanglobulin -G, -M und-A inkubiert. Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) beziehen das Antiserum, zumeist konjugiert, von der Firma Hyland, München; bei Bedarf wird jedoch auch selbst konjugiert, laut Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) nach der Methode von Marshall, J.D. und Mitarb. (1968).
Nach Mueller-Eckhardt, Ch. und Mitarb. (1968) werden die Präparate mit 1:2 in kochsalzverdünntem, fluoreszenzmarkiertem Antiserum für 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert.
Abschließend werden die Präparate nach Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) gründlich mit einer Pufferlösung, pH 7,0 bis 7,5

gespült. Für die Untersuchung werden die Präparate in gepuffertem Glycerin eingebettet (pH 7,2 bis 7,5) umd im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als Lichtquelle benutzen Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) eine Quecksilberhochdrucklampe mit dem Erregerfilter I und dem Sperrfilter 43. Das Sperrfilter im Okulartubus absorbiert das kurzwellige Erregerlicht und ist nur für das langwellige Fluoreszenzlicht durchgängig, Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970).
Die Autoren beschreiben und diskutieren im folgenden die Schwierigkeiten und Fehlerquellen, die bei der beschriebenen immunfluoreszenztechnischen Diagnostik von ANF auftreten. Tabelle 7 faßt diese Fehlerquellen zusammen:

FEHLER:	FOLGEN:
Ungenügende Durchmischung der Patientenseren nach Auftauen vor dem Gebrauch.	Falsch positive tüpflige Kernreaktionen; Ungleichmäßige Färbung an verschiedenen Stellen des Präparats.
Falsche Temperatur des Patientenserums vor dem Gebrauch (statt der richtigen Zimmertemperatur).	Falsch positive tüpflige Kernreaktionen bei ANF-freien Seren nachgewiesen wurden.
Unzureichende Spülung der Präparate nach der Inkubation mit konjugiertem Antiserum in Phosphatpufferlösung mit überalterten Patientenseren oder Konjugaten.	Fluoreszierende Verschmutzungsflecke im Gewebsschnitt, die jedoch von positiven Kernreaktionen leicht zu unterscheiden sind, weil sie über Zytoplasma und Kernen liegen.
Falsche Schnittechnik des Lebergewebes mit ungleichmäßigen Gewebestrukturen.	„Kernkometen" oder Ausziehen des Kernantigens in Schnittrichtung; Extranukleäre leichte Flecke durch Verspreigung von Kernsubstanz ins

FEHLER:	FOLGEN:
	Zytoplasma; Mangelnde Unterscheidbarkeit zwischen „ homogenen" und „shaggy" Kernreaktionen
Überalterung der Schnitte	Unspezifische, allerdings leicht erkennbare Reaktionen, andererseits kann die Bindungsfähigkeit geringer werden und somit eine falsch positive Reaktion vorgetäuscht werden.
Falsche pH-Werte der Pufferlösung (zu niedrig, zu hoch, zu lange Inkubation mit Phosphatpuffer)	Unspezifische Fluoreszenzniederschläge im Präparat; Auflösung der AG-AK-Komplexe; Unspezifisch gesprenkelte Zellkernreaktionen.

Tab. 7: Fehler bei der immunfluoreszenztechnischen Analyse von ANF, nach Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970).

Die direkte Immunfluoreszenzmethode erweist sich auf Grund von Untersuchungen von Bäumer, A. und Brinkmann, A. (1970) als weniger geeignet und ergiebig.
Nach Erfahrungen von Mueller-Eckhardt, Ch. und Mitarb. (1968) kann außerdem zusammenfassend festgestellt werden, daß die indirekte Immunfluoreszenzmethode auch im Vergleich mit dem Antiglobulinkonsumptionstest (weiterhin AGKT) auf Grund ihrer besseren Reproduzierbarkeit und größeren Empfindlichkeit überlegen ist. Der AGKT hat zudem den Nachteil, daß er keine Aussage über den Titer und die Immunglobulinklasse der ANF ermöglicht, Mueller-Eckhardt, Ch. und Mitarb. (1968).
Nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) ist die Aufstellung eines Spektrums einzelner Antikörper gegen Kernbestandteile, insbesondere gegen DNS an Gewebsschnitten mit Hilfe des immunfluoreszenzoptischen Bildes für die routinemäßige Bestimmung zu ungenau und führt in der Mehrzahl der Fälle wegen Überlagerung verschiedener Antikörpermuster zu keinem einheitlichen Ergebnis. Dies gilt

besonders für die immunhistologischen Fluoreszenzbilder,die an Leberschnitten oder anderen Organpräparaten entstehen, Helmke, K. und Mitarb. (1974).

Selektiver Anti-DNS-Nachweis:
Angesichts der weitgehend gesicherten Bedeutung von DNS-Antikörpern für die Pathogenese des Lupus erythematodes (weiterhin: LE) rückte der Anti-DNS-Nachweis in den Vordergrund des Interesses, Hoppe, L. (1977). Ein erster Schritt war der Nachweis von Anti-dDNS- mit HCL - behandelten Hühnererythrozyten, Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965).
Die besondere Bedeutung dieser Methode liegt in der Behandlung des Antigens - in diesem Fall Hühnererythrozytenkerne, Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965): Die Autoren fertigen dünne Blutausstriche an, die nach der Trocknung mit n/10 HCl hämolysiert werden. Verdünnte Salzsäure erweist sich nach Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965) dem destillierten Wasser als überlegen. Durch die Hämolyse werden die Bindung der ANF and die Erythrozytenkerne erleichtert und das fluoreszenzlöschende Hämoglobin entfernt, Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965). Fixierungsmittel, die oft spezifische Bindung negativ beeinflussen und die unspezifische Fluoreszenz verstärken, werden von den Forschern nicht benutzt. Auf die hämolysierten Blutausstriche wird zunächst 1:1 verdünntes Patientenserum getropft; nach 30 min wird in Phosphatpuffer gewaschen und für weitere 30 min das fluoreszierende Anti-7 S-Gammaglobulinserum zugegeben. Die Beurteilung der wiederholt gewaschenen und in einem Glycerin-Puffergemisch eingedeckten Präparate erfolgt nach Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965) unmittelbar nach der Herstellung mit einer Dunkelfeld-Fluoreszenzmikroskopiereinrichtung. Nach Fischer, K. und Poschmann, A. (1971) zeigt unter den verschiedenen im Handel erhältlichen FITC-markierten Anti-Human-IgG-Seren bei diesem Test das Präparat der Behringwerke eine besonders kräftige und spezifische Reaktion.
Die Methode nach Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965) soll in Abb. 5 an Hand des IgG-Anti-DNS-Nachweises bildlich zusammengefaßt werden.

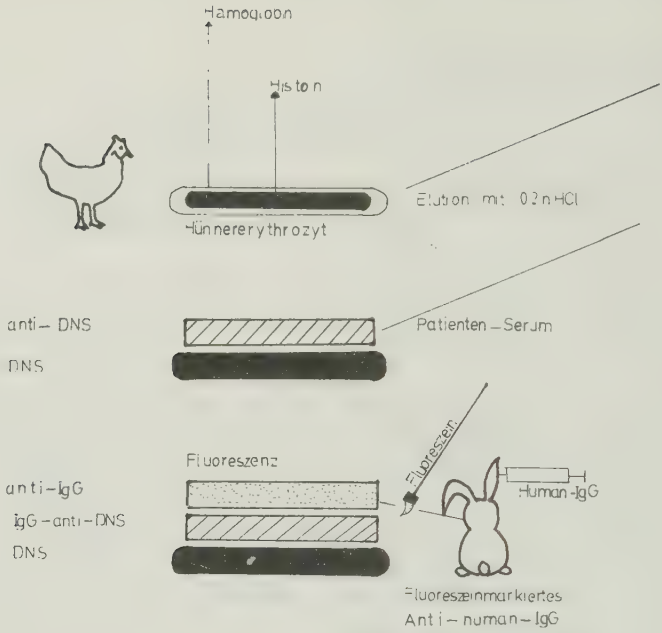


Abb. 1: Indirekt [illegible] zum Nachweis von IgG-Anti-DNS, nach Fischer, K., 1970

Helmke, K. und Mitarb. (1974) erweitern diese Immunfluoreszenztechnik dahingehend, daß sich mit dieser Methode auch Antikörper gegen native und denaturierte (Einzelstrang-) DNS bestimmen lassen. Die indirekte Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten von Rattenlebern wird von den Autoren parallel als Kontroll- und Vergleichsuntersuchung angewandt.
Die Methodik des immunluoreszenzoptischen Verfahrens nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) zum Nachweis von Anti-DNS-Antikörper im Einzelnen:

Reagenzien:

1. NaCl - Phosphatpuffer, pH 7,2 : 42,5 g NaCl, 6,7 g Na_2HPO_4 x H_2O 1,95 g NaH_2PO_4 x H_2O ad 5 000 ml mit demineralisiertem Wasser auffüllen.
2. Citratpuffer: 0,88 g NaCL, 0,44 g Na-Citrat; auf 100 ml mit demineralisiertem Wasser auffüllen.
3. FITC-markierte Anti-IgG der Firma Behring.
4. DNS-Lösung.
   A. 2,5 mg DNS aus Kälberthymus (Firma Merck), gelöst in Citratpuffer, 1ml.
   B. Denaturierte DNS zunächst wie A., dann 10 min auf 100° C im Wasserbad erhitzen, danach rasches Abkühlen.

Kernpräparation:
Dünne Ausstriche gewaschener Hühnererythrozyten auf acetongereinigten Objektträgern werden zunächst nach dem von Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965) angegebenem Verfahren zweimal in 0,2 N Salzsäure für 2 bis 3 min behandelt. Danach werden die Objektträger 1 Stunde bei 37° C getrocknet. Drei Stellen des Objektträgers werden markiert: A,B,C. Nach Harbers, E. (1965) und Helmke, K. und Mitarb. (1974) kommt es durch dieses Verfahren neben der Hämolyse auch zu einer Sprengung der Kernmembran und zu einer Ausschwemmung löslicher Proteine und Histone. Auf dem Objektträger verbleibt somit nur ein DNS-Proteinkomplex und freie DNS, die zum Teil durch die Behandlung denaturiert ist, Helmke, K. und Mitarb. (1974).

Das Patientenserum wird 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnt. Von jeder Verdünnung werden drei Proben á 0,1 ml (A,B,C) angesetzt:

Zu A wird 0,1 ml Phosphatpuffer, zu B 0,1 ml einer 25%igen nativen DNS-Lösung, zu C eine 25%ige Lösung einer hitzedenaturierten DNS gegeben.
Die Proben werden 1 Stunde bei 37° C und leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Die Objektträgerausstriche werden anschließend an den markierten Stellen mit den verdünnten Seren überschichtet und eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert.
Nach Abspülen des Serums erfolgt Überschichtung mit FITC-markiertem Anti-IgG und Inkubation für eine weitere halbe Stunde. Danach werden die Objektträger erneut in Puffer gewaschen und anschliessend in einer Glycerinphosphatpufferlösung (1:3) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt.
Hierbei können Helmke, K. und Mitarb. (1974) folgende Phänomene beobachten:

1. Gleichmäßige Fluoreszenz aller überschichteten Stellen:
   Es handelt sich um Antikörper gegen den Proteinkomplex, die sich nicht durch DNS absorbieren lassen.
2. A und B fluoreszieren hell, C ist abgeschwächt oder dunkel:
   Es sind lediglich Antikörper gegen denaturierte DNS vorhanden.
3. A fluoresziert hell, B und C zeigen abgeschwächte oder keine Fluoreszenz:
   Es liegen Antikörper gegen native und denaturierte DNS vor.
4. Die Konstellation A und C hell, B dunkel, kommt nach den Erfahrungen von Helmke, K. und Mitarb. (1974) nicht vor, da bei allen Fällen von Lupus erythematodes dissemenatus (weiterhin LED) auch Antikörper gegen denaturierte DNS vorhanden sind, jedoch nur in einem Teil der Fälle auch Antikörper gegen native DNS vorkommen.

Nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) bedeutet somit eine deutlich abgeschwächte oder fehlende Fluoreszenz an denjenigen Stellen des Präparats, die mit DNS-absorbiertem Patientenserum überschichtet wurden, den Nachweis der spezifischen DNS-Antikörper.

Mit der beschriebenen Methode wurden 3 285 Seren von Patienten mit LED, rheumatoider Arthritis (PcP), aggressiver Hepatitis, Schilddrüsenerkrankungen, Sklerodermie, Lungenfibrose und anderen Autoimmunkrankheiten oder mit nicht näher definierten Krankheitsbildern von Helmke, K, und Mitarb. (1974) untersucht. Diese modifizierte Immunfluoreszenzmethode nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) zeigt in den meisten Fällen eine höhere Empfindlichkeit als die Untersuchungen an Leberschnitten. Die Untersuchungsergebnisse der Seren von Patienten mit LED stimmen nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) mit radioimmunologisch erhobenen Befunden im „Farr-Assay" oder der „Farr-Technik", Kerl, H. und Mitarb. (1975), überein.
Hoppe, I. (1977) jedoch sieht in der „Farr-Technik" die gegenwärtig optimale Nachweismethode auf Antikörper gegen DNS:

> ^{3}H-Thymidin-markierte nDNS wird mit Patientenserum inkubiert; enthält es Anti -nDNS, so kommt es zu einer Verbindung des Antikörpers mit dem markierten Antigen. Der DNS-Anti-DNS-Komplex kann mit Ammoniumsulfat gefällt und aufgrund der Anreicherung von Radioaktivität im Sediment quantifiziert werden, Hoppe, I. (1977). In weiteren radioimmunologischen Testsystemen werden 14 C- oder 125 J- markierte ds-DNS verwendet, Kalden, J. R. (1975).

Neben der hohen Empfindlichkeit des Nachweises von Anti-DNS-Antikörpern nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) dürfte der selektive Nachweis von Antikörpern gegen native DNS (nDNS) und denaturierte (dDNS) für die Diagnose und Differentialdiagnose der Kollagenosen, insbesondere des LED, von Bedeutung sein. Übereinstimmend berichten Cohen, S.A. und Mitarb. (1971) und Helmke, K, und Mitarb. (1974), daß alle LED-Patienten Antikörper gegen denaturierte DNS haben, jedoch nur ein Teil auch Antikörper gegen native DNS aufweisen. Antikörper gegen native DNS wurden bisher aber nur beim LED beschrieben, Cohen, S. A. und Mitarb. (1971); Helmke, K. und Mitarb. (1974); Hoppe, I. (1977) und zwar auch dann, wenn der antinukleäre Faktor negativ war, Hoppe, I. (1977). Daher erklärt sich nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) die

konstante Kombination von Antikörpern gegen denaturierte DNS und Antikörper gegen native DNS. Bei allen Formen des LED sind demnach Antikörper gegen denaturierte DNS nachzuweisen, diese kommen jedoch auch gleichzeitig bei anderen Krankheitsbildern, insbesondere bei den Kollagenosen vor. Somit ist der diagnostische Wert dieser Antikörper zunächst nur auf den Hinweis eines Autoimmunprozesses beschränkt, Helmke, K, und Mitarb. (1974). Der Nachweis von Antikörpern gegen native DNS dagegen kann die Diagnose LED nach den bisherigen Erfahrungen praktisch sichern, Helmke, K. und Mitarb. (1974). Hinzu kommt, daß die Antikörper vor allem bei Patienten mit einer Lupusnephritis gefunden werden, Cohen, S. A. und Mitarb. (1971). Diese Antikörper könnten daher nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) durchaus auch prognostisch von Bedeutung sein. Hoppe, I. (1977) berichtet, daß Anti-nDNS sich als ein guter Indikator der Krankheitsaktivität erweist, indem sie im Schub annähernd 100 %ig, in Remission zwischen 0 und 50 % zu finden ist. Eine ähnliche gute Aktivitätsanzeige liefert nach Hoppe, I. (1977) lediglich noch das Komplement, dessen C'3-Stufe in aktiven Krankheitsphasen stets signifikant vermindert gefunden wird, Hoppe, I. (1977). Ein Vergleich der Nachweistechnik von Antikörpern gegen native bzw. denaturierte DNS zeigt nach Kerl, H. und Mitarb. (1975) und Mongeat, J. N. und Mitarb. (1974), daß der Anti-dDNS-Nachweis hinsichtlich der Spezifität (Differentialdiagnose!) und Empfindlichkeit (Verlaufskontrolle!) eindeutig überlegen ist.

Im Rahmen der indirekten Fluoreszenztechnik führt eine Differenzierung der antinukleären Antikörper zu einer wesentlichen Verbesserung ihrer diagnostischen Aussagekraft. So kann dieses Nachweisverfahren als eine quantitative Methode herangezogen werden, indem der Titer der antinukleären Antikörper bestimmt wird, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Zum Beispiel werden bei Patienten mit LED und bei solchen mit progressiver Sklerodermie häufiger hohe antinukleäre Antikörpertiter gefunden als bei Patienten, die an rheumatoider Arthritis leiden, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

Titerbestimmungen sollten bei positivem Ausfall der Fluoreszenzreaktionen immer durchgeführt werden; unter gleichzeitiger Be-

rücksichtigung anderer Fluoreszenzparameter ermöglichen sie oftmals eine genaue Differentialdiagnose, Hoppe, I. (1977). Die Titer unterliegen wohl abhängig von der Krankheitsaktualität Schwankungen, werden aber nie negativ, so daß die grundsätzliche Bedeutung des ANF-Nachweises als Suchtest nach Hoppe, I. (1977) nie in Frage gestellt ist.

Die Zuordnung der antinukleären Antikörper zu den verschiedener Immunglobulinklassen und -subklassen führt zur weiteren Differenzierung der Antikörper. Hierbei werden monospezifische Antiseren verwendet, die gegen die verschiedenen Immunglobulinklassen, bzw. -subklassen gerichtet sind. So gehören beispielsweise die antinukleären Antikörper von Patienten mit LED und Sklerodermie vorwiegend der IgG-Klasse an, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), genauer - wie später festgestellt wurde - den Subklassen vom Typ IgG_1 und IgG_3, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Die Aussagekraft dieser Bestimmungen wird jedoch bei denjenigen Patienten vermindert, die zugleich zwei oder mehrere Ig-Klassen der ANF aufweisen, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Aufschlußreicher als die Klassenzugehörigkeit sind wohl die Bindungsmuster der ANF.

Das unterschiedliche Bindungsmuster („pattern") erklärt man sich durch das Vorkommen von Autoantikörpern gegen verschiedene Kernstrukturen, Helmke, K. und Federlin, K. (1976); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

Abhängig also vom Antikörpersubstrat kommen vier verschiedene Fluoreszenzmuster in Frage:

1		homogen bis diffus [illegible] ganz Kernes
2		fleckig [illegible] sich in basisch färbenden Partikeln
3		ringförmig und zottig stärkere Färbung des äußeren Kernsaumes
4		hell klar Färbung der Kernkörperchen

Abb. 3 nach Hyland Immunfluoreszenz-Information

Weit verbreitet ist die homogene Fluoreszenz, hervorgerufen durch Antikörper gegen Desoxyribonukleoprotein- ähnlich wie das LE-Zellphänomen, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Das homogene oder diffuse Bindungsmuster kommt sowohl beim LED, besonders bei geringer Krankheitsaktivität, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), als auch bei rheumatoider Arthritis vor, Müller, W. (1975). Es ist ebenfalls bei anderen Autoimmunkrankheiten nachzuweisen, zum Beispiel bei chronisch-aggressiver Hepatitis mit verschiedenen Autoantikörpern, und auch bei klinisch gesunden Personen, Berg, P. A. (1976), Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

Die fleckförmige („speckled") Fluoreszenz weist auf Nukleoproteide hin, die mit Puffer extrahierbar oder in physiologischer NaCl-Lösung löslich sind, Hoppe, I. (1977); Maas, D. und Schubothe, H. (1973): Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Diese Nukleoproteide sind zum Teil gegen Desoxyribonuclease, Ribonuclease, sowie gegen Pepsinabbau resistent, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Dieses Kernmuster ist ebenfalls nicht für eine bestimmte Krankheit charakteristisch, doch durch gleichzeitige Titerbestimmung ergeben sich Unterschiede, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Hohe Titerwerte sind typisch für das „mixed connective tissue disease", Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), das zustäzlich RNS-haltiges extrahierbares nukleäres Antigen (ENA) zum Kennzeichen hat, Sharp, G. C. und Mitarb. (1972).
Fleckförmige Kernfluoreszenz und hohe Titerwerte findet man ferner beim LED und der progressiven Sklerodermie, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Andere Erkrankungen weisen dieses Bindungsmuster seltener und in niedrigen Titerwerten auf, Rosenthal, M. (1976).
Als LE- und DNS-spezifisch gilt die seltene ringförmige oder membranöse Fluoreszenz, Hoppe, I. (1977). Sie wird besonders bei aktiven Formen von LED beobachtet, während bei einer Remission dieser Erkrankung diese Bindungsmuster häufig in die diffuse Form übergeht, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).
Die nukleoläre Fluoreszenz wird hochtitrig vor allem bei der progressiven Sklerodermie angetroffen, Rosenthal, M. und Mitarb.

(1976); nur ausnahmsweise und mit niedrigen Titern wird dieses Fluoreszenzmuster beim LED und bei der rheumatoiden Arthritis festgestellt, Häntzschel, H. und Mitarb. (1976); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Substrat dieses Bindungsmusters ist RNS, Monegat, J. N. und Mitarb. (1974); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976); Sharp, G. C. und Mitarb. (1972).
Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) beobachten nicht selten verschiedene gleichzeitig vorkommende Bindungsmuster. Hier gilt es, - so Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), - die Prädominanz bestimmter Antikörpermuster nachzuweisen.
Der Vollständigkeit halber sei noch die Bedeutung der granulozytenspezifischen antinukleären Antikörper erwähnt. Spezifisch gegen menschliche Granulozytenkerne gerichtete antinukleäre Antikörper können häufig in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen werden, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Es sind nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) vor allem die schweren Formen wie das Felty-Syndrom, das mit einer erheblichen Leukopenie einhergeht, bei denen derartige Antikörper vorkommen. Leider sind jedoch diese Antikörper trotz ihres gehäuften Vorkommens nicht für diese Erkrankung spezifisch, denn nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) werden die granulozytenspezifischen antinukleären Antikörper auch immer wieder bei anderen Patienten nachgewiesen, besonders bei solchen mit LED.
Ein weiterer antinukleärer Antikörper sei aufgeführt, der in den letzten Jahren diagnostische Bedeutung erlangte:
Das extrahierbare nukleäre Antigen. Dieser Antikörper ist gegen extrahierbare Kernbestandteile gerichtet, die mit Ribonuclease abgebaut werden können und mittels einer Hämagglutinationsreaktion nachgewiesen werden, Sharp, G. C. und Mitarb. (1972). Wie jene Autoren feststellen, ist dieser Antikörper (ENA, extractable nuclear antigen) recht charakteristisch für „mixed connective tissue disease" (MCTD). Da nukleäre Antigene bei anderen Bindegewebserkrankungen ribonucleaseresistent sind, ist nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) der Nachweis solcher Anti-ENA von großer differentialdiagnostischer Bedeutung.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Der fluoreszenzoptische ANF-Nachweis ist nicht nur ein Suchtest, sondern ermöglicht an Hand von Titerhöhe und Fluoreszenzmuster auch eine bestimmte Differentialdiagnose. Eine Verbesserung der diagnostischen Aussagekraft mag in Zukunft durch Berücksichtigung des Immunglobulintyps des beobachteten Autoantikörpers, sowie der Komplementbindung möglich sein, Hoppe, I. (1977); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

Das besondere Interesse einiger Forscher gilt der Komplementbindung und deren Aktivierung durch die Antigen-Antikörperverbindung, da man annimmt, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), daß Gewebszerstörung und Autoaggression dieser antinukleären Antikörper durch Aktivierung des Komplementsystems bedingt sein können. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethoden ist man in der Lage, nicht nur die antinukleären Antikörper, sondern simultan auch verschiedene Komplementkomponenten (C3, C1q) nachzuweisen; dabei wird die doppelte Markierung durchgeführt, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Es wird für den Nachweis von antinukleären Antikörpern ein mit FITC-markiertes Antiserum gegen Humanglobulin verwendet und für den Nachweis der Komplementkomponente C3 ein Rhodaminisothiocyanat-markiertes spezifisches Antiserum, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976); Wick, G. und Mitarb. (1976). Besonders häufig und in hohen Titern findet sich die Bindung von antinukleären Antikörpern an die dritte Komplementkomponente (C3) bei Patienten mit LED und progressiver Sklerodermie, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Außerdem korrelieren C3-Bindungen und teilsweise auch der Titer deutlich mit der Aktivität der Erkrankung, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Die besten Ergebnisse für die C3-Bindung an antinukleäre Antikörper werden nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) erzielt, wenn natives Patientenserum verwendet wird.

Als ebenfalls komplementbindend erwiesen sich - wie verschiedene Forschergruppen übereinstimmend feststellten: Wiik, A. und Munthe, E. (1972); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) - die bei der rheumatoiden Arthritis vorkommenden granulozytenspezifischen antinukleären Antikörper (s. oben). Dies ist besonders bei den schweren Formen dieser Erkrankung der Fall, die mit

Granulozytopenie einhergehen, Wiik, A. und Munthe, E. (1974). Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) sehen damit die Möglichkeit, einen pathogenetischen Mechanismus für die Entstehung von Granulozytopenien beim Felty-Syndrom darzustellen. Beim Nachweis von komplementbindenden antinukleären Antikörpern bei Patienten mit rheumatoider Arthritis machen Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) auf Grund von eigenen Erfahrungen darauf aufmerksam, daß die Komplementbindung unter Umständen auch durch granulozytenspezifische antinukleäre Antikörper verursacht werden kann.

Der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von C1q - Bindungen führt den Untersuchungen von Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) zufolge zu keiner krankheitsspezifischen Zuordnung. Daher postulieren Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), solle man für die Differenzierung und Spezifizierung der antinukleären Antikörper die C3 - Bindungskapazität und nicht die C1q - Bindung heranziehen.

Neben den antinukleären Antikörpern hat man bei verschiedenen autoaggressiven Erkrankungen auch Antikörper gegen zytoplasmatische (mitochondriale) Bestandteile beobachtet, Berg, P. A. und Mitarb. (1975). Dabei handelt es sich vor allem um antimitochondriale Antikörper, die vorzugsweise mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmethode an Rattennierentubuli nachweisbar sind, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Übereinstimmend stellten verschiedene Forscher diese Antikörper beim LED und beim medikamenteninduzierten LED-Syndrom fest, Maas, D. und Schubothe, H. (1973); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), Berg, P.A. und Mitarb. (1975). Die beschriebenen Untersuchungen zeigen, daß mit Hilfe verschiedener Differenzierungsmöglichkeiten die diagnostische Aussagekraft des antinukleären Antikörpernachweises wesentlich verbessert werden kann.

Trotz der Tatsache, daß jeder dieser Differenzierungen für sich keine spezifische Diagnose erlaubt, weist ein bestimmtes Differenzierungsmuster doch auf das Vorliegen einer bestimmten Erkrankung hin.

Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) schlagen daher ein in Tabelle 8 wiedergegebenes Differenzierungsschema für alle Patienten vor, bei denen antinukleäre Antikörper nachgewiesen werden konnten und die Zuordnung zu einer bestimmten Erkrankung nicht möglich ist.

1. Titerbestimmungen
2. Einordnung in die verschiedenen Immunglobulinklassen
3. Immunfluoreszenzbindungsmuster
4. Nachweis der Komplementbindung
5. Nachweis spezifischer Kernantikörper
   - Anti DNS
   - Anti ENA
   - GS ANA

Tab. 8: Differenzierungen der antinukleären Antikörper, nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

In Tabelle 9 soll nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976) das „Differenzierungsmuster" einiger bekannter Bindegewebserkrankungen dargestellt werden. Die Autoren wollen diese Zusammenstellung als einen Hinweis und nicht als Beweis für das Vorliegen einer bestimmten Erkrankung verstanden wissen.

Kriterien	Lupus erythematosus disseminatus	progressive Sklerodermie	„mixed connective tissue disease"	chronische Polyarthritis	gesunde ANA-Träger
Titer der antinukleären Antikörper	hoch	hoch	hoch	mäßig	niedrig
Immunglobulinklassen der antinukleären Antikörper	vorwiegend IgG, häufig IgE	vorwiegend IgG	vorwiegend IgG	häufig IgM, selten IgE	häufig IgM
charakteristisches Fluoreszenzmuster der Kerne	periphere Fluoreszenz	nukleoläre Fluoreszenz	geprenkelte Fluoreszenz	homogene oder gesprenkelte Fluoreszenz	homogene oder gepsrenkelte Fluoreszenz
charakteristische Kernantikörper	Antikörper gegen native DNS	Antikörper gegen Uracil-Basen der RNS	Antikörper gegen ribonuclease-empfindliche extrahierbare Kernantigene	granulozytenspezifische Antikörper	Ø
C3 Bindung	stark	stark	mäßig bis stark	keine bis schwach	Ø

Tab. 9: Charakteristische Befunde bei der Differenzierung antinukleärer Antikörper, („Differenzierungsmuster"), nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

Trotz der weit verbreiteten Anwendung des indirekten Immunfluoreszenztestes fehlt noch immer eine Standardisierung dieser Methode, Kalden, J. R. (1975); Helmke, K. und Mitarb. (1974). Diese Standardisierung ist schwierig, und darin liegt der Nachteil der immunfluoreszenzoptischen Methode, Helmke, K. und Mitarb. (1974).
Einen ersten Schritt hinsichtlich der Standardisierung des verwandten Zellmaterials stellen Untersuchungen von Fischer, K. und Dorszewski, E. (1965), sowie Albini, B. und Wick, G. (1972) mit hämolysierten und formalisierten Zellpräparationen von Hühnererythrozyten dar, die bis zu 18 Monaten als Antigenquellen verwendbar sind, Albini, B. und Wick, G. (1972). Trotzdem müssen Helmke, K. und Mitarb. (1974) bei der Entwicklung ihrer Immunfluoreszenzmethode zum Nachweis von Anti-DNS-Antikörpern feststellen, daß die Intensität der Fluoreszenz unter anderem nicht nur abhängig ist vom Gehalt an Antikörpern im zu untersuchenden Serum, sondern auch von der Markierung, der Konzentration und Bindungsfähigkeit der Antihumanseren. Derartige variablen Faktoren lassen sich nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) auch nicht vollkommen dadurch ausgleichen, daß man jeweils negative und positive Kontrollseren gleichzeitig untersucht. Selbst in Verdünnungsreihen lassen sich nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) nur eingeschränkte quantitative Aussagen machen, will man nicht das aufwendige „Schachbrett-Titrationsverfahren" nach Beutner, E. H. (1971) anwenden, Wick, G. und Mitarb. (1976).
Die Schwierigkeit der Standardisierung wird an einem weiteren methodischen Problem des Immunfluoreszenzverfahrens deutlich: bei Inkubation nativer DNS kommt es nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) nur selten zu einer totalen Absorption des Antikörpers. Die meisten Seren mit Anti-DNS-Antikörpern zeigen nur eine abgeschwächte Fluoreszenz, Helmke, K. und Mitarb. (1974). Diese Autoren vermuten die Ursache hierfür darin, daß Antikörper gegen native DNS nur in Kombination mit anderen Antikörpern - vor allem denaturierten Anti-DNS-Antikörpern - vorkommen, Cohen, S.A. und Mitarb. (1971).
Außerdem kann nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) die Behandlung der Erythrozytenkerne mit Salzsäure eine Denaturierung eines

Teiles des Kernproteins und der DNS hervorrufen, wodurch hier eine stärkere Antigenidentität mit denaturierter DNS entsteht. Dieses Phänomen führt dann naturgemäß zu einer stärkeren Interferenz mit der denaturierten Absorbens-DNS, Helmke, K. und Mitarb. (1974).
Die variablen nachteiligen Faktoren des Immunfluoreszenzverfahrens - an der Methode nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) aufgezeigt, - können eventuell durch die Verwendung industriell mit Antigen beschichteter Objektträger aufgehoben werden. Natürlich steht die Wirtschaftlichkeit dieser Testkombinationen im Vordergrund: alle für den Reaktionsablauf erforderlichen Reagenzien sind einem sog. Kit beigegeben, die der ständigen Qualitätskontrolle unterworfen sind. So sind zur Diagnostik der Autoimmunkrankheiten folgende Teste im Handel erhältlich:

1. ANA-Test, Nachweis von Antikörpern gegen DNS, RNS, Nucleoproteine und pufferlösliche Proteine.

2. AMA-Test, Nachweis von Antikörpern gegen Mitochondrien.

3. ASMA-Test, Nachweis von Antikörpern gegen glatte Muskulatur.

4. ATA-Test, Nachweis von Schilddrüsen-Antikörper.

5. ferner: PcA, Anti-Parietalzellen-Antikörper; HMA, Anti-Herzmuskel-Antikörper.

Erhältlich sind diese Testkits u.a. bei:

Proma GmbH Immundiagnostika; Fa. Hyland-Travenol; BAG GmbH, Lich.

Die Wirtschaftlichkeit dieser Testkits wird an anderer Stelle diskutiert.

5.2. Nachweis von Immunkomplexniederschlägen

Mellors, R. C. und Ortega, L. G. wiesen 1956 erstmals an Autopsiematerial von Patienten mit Glomerulonephritis (weiterhin GN) Gammaglobuline an den Basalmembranen der Glomerula nach und objektivierten damit die Bedeutung immunologischer Vorgänge bei der Entstehung der GN.
Weitere Untersuchungen: u. a. Freedman, P. und Markowitz, A. A. (1962), bestätigen diese Befunde und unterstreichen ihre pathogenetische Bedeutung durch den Nachweis von Komplement an den Stellen der Gammaglobulinbindung.
Zunehmende Bedeutung haben in den letzten Jahren die immunhistologischen Befunde von Nierenbiopsiematerial für Pathogenese, Diagnostik und Differentialdiagnose, Therapie und Prognose bestimmter Nierenerkrankungen erlangt, Storch, W. (1972); Bohle, A. und Mitarb. (1969, 1974 b, 1974 c); Bohle, A. und Wehner, H. (1970); Wehner, H. und Mitarb. (1969); Ehrenreich, Th. und Churg, J. (1968); Kettler, L. H. und Mitarb. (1973); Kincaid-Smith, P. und Hobbs, J. B. (1972); Thoens, W. (1973); Zollinger, H. U. (1971). Voraussetzung dafür war die Einführung der Nierenbiopsie - (seit 1954 werden Nierenbiopsien ausgeführt, Thoenes, G. H. (1973)) - in die klinische Diagnostik.
Jedoch gebührt auch der Elektronen- und der Lichtmokroskopie ein fester Platz in der klinischen Diagnostik. Auf keinen Fall kann die eine Untersuchungsmethode die andere ersetzen. Thoens, G. H. (1973); Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978). So sind Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978) der Meinung, daß mit Hilfe einer sorgfältigen lichtmikroskopischen Untersuchung ein großer Protzentsatz aller Nephropathien zuverlässig diagnostiziert werden kann. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung ist nach Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978) grundsätzlich indiziert bei Verdacht auf Alport Syndrom, benigne (familiäre) Hämaturie, Nail-Patella-Snydrom, aber auch zum Nachweis einiger wichtiger morphologischer Charakteristika, die Rückschlüsse auf die Ätiologie erlauben: Viren, endotheliale virusähnliche Strukturen und kristalloide Strukturen der Depots bei Kryoglobulinämie. Bei allen anderen glomerulären Nephro-

pathien liefert die elektronenmikroskopische Untersuchung eine wesentliche zusätzliche Information und dient damit besonders der exakten Klassifizierung der Glomerulonephritiden, Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978). Wenn man aber in der Niere ablaufende Immunreaktionen als primum movens der Nephritis akzeptiert, dann erscheint die Immunfluoreszenz-Histologie besonders geeignet, dynamische Vorgänge der Pathogenese mit dem nach Thoens, G. H. (1973) „statischen" morphologischen Endresultat zu verbinden, Thoens, G. H. (1973). So erlaubt allein die Immunfluoreszenz-Histologie (Immunhistologie) die unzweideutige Diagnose der Antibasalmembran-Antikörper-GN (Masugi-Nephritis) und einer IgA-mesangialen GN.
Tabelle 10 faßt die zu vergleichenden Diagnostikmethoden bei Nierenbiopsie und deren primäre Anwendungsbereiche zusammen:

Elektronenmikroskopie	Immunfluoreszenz
I. Einzige diagnostische Methode	
Alport-Syndrom	Anti-Basalmembran-Antikörper-Glomerulonephritis
Benigne, familiäre Hämaturie Nail-Patella-Syndrom	IgA-mesangiale Glomerulonephritis
Nachweis von Viren, endothelialen virusähnlichen Strukturen, kristalloiden Strukturen in Depots	Nachweis von Antigenen (DNS, Medikamente, Virus-, Bakterien-, Protozoen-Antigen)
II. Zusätzliche diagnostische Methode	
Exakte Klassifizierung der Glomerulonephritis	
Differentialdiagnose des lichtmikroskopischen Befundes:	Intrarenale / intraglomeruläre Verteilung von Immunglobulinen (Prognose/Verlaufsbiopsien)
	Differentialdiagnose:
Glomeruläre Minimalveränderung	Glomerulonephritis versus Nicht-Glomerulonephritis
Herdförmig betonte proliferative / sklerosierende Glomerulonephritis	Eklampsie
	Akutes Nierenversagen
	Glomeruläre Minimalveränderung
	Glomerulonephritis versus Transplantatglomerulopathie
Membranoproliferate Glomerulonephritis	

Tab. 10: Elektronenmikroskopie und Immunfluoreszenz in der Nierenbiopsiediagnostik
nach Mihatsch, M.J. und Zollinger, H.U. (1978)

Die Bedeutung der Immunfluoreszenz für die Identifizierung von Antigenen (beispielsweise nukleäre Faktoren beim LE; Medikamente wie Penicillamin; Viren, z. B. Hb_s) wird nach Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978) in der Zukunft sicher noch zunehmen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Immunfluoreszenz in Anlehnung an die Erfahrungen und Maßstäbe der Pathohistologie eine begrenzte diagnostische Selbständigkeit erhalten hat, Thoenes, G. H. (1973). Sie bedarf der Bestätigung und Ergänzung durch die Histologie, Thoenes, G. H. (1973); daher wird sich ein optimales Resultat in der Nierenbiopsiediagnostik nur bei simultaner Anwendung aller genannten Methoden ergeben und bei optimaler Kooperation klinisch-pathologischer Fachbereiche, Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978).

Verarbeitung von Nierenbiopsien, nach Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978).
Das nachfolgend skizzierte technische Verfahren der Verarbeitung von Nierenbiopsien findet sowohl in der Licht- und Elektronenmikroskopie als auch beim Immunfluoreszenztest Anwendung.
Die Darstellung soll zeigen, daß diese Untersuchungsmethoden auch für den klinisch arbeitenden Pädiater nicht mit einem ungebührlichen Zeitaufwand verbunden sind, Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978). Untersuchungen von Nierenbiopsien mit Hilfe aller drei Methoden sind nur möglich, wenn zwei Nadelbiopsien oder eine Messerbiopsie vorliegen. Mit einer Rasierklinge werden vom ersten Nierenbiopsiezylinder bei ausreichender Größe (über 1 cm lang) auf einer Teflon-Unterlage vom oberen und unteren Ende des Zylinders je 1 mm unter ziehender Bewegung (nicht quetschen!) abgeschnitten. Die Gewebefragmente - für die Elektronenmikroskopie vorgesehen - werden anschließend noch zwei - bis dreimal zerkleinert und in 2,5%-igem Glutaraldehyd fixiert. Je nachdem, wie groß der zweite Nierenbiopsiezylinder ausfällt, wird der Rest des ersten entweder für die Lichtmikroskopie oder für die Immunfluoreszenz verwendet. Das Tieffrieren des Immunfluoreszenzmaterials erfolgt nach Mihatsch, M. J. und Zollinger, H. U. (1978) am besten in flüssigem Stickstoff oder mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan. (Das Gewebe für die Lichtmikroskopie wird in 4%igem gepuffertem Formalin fixiert.)

Schnittpräparate für immunhistologische Untersuchungen müssen nach Coons, A. H. und Kaplan, M. H. (1958) zwei Forderungen erfüllen:

1. Die im Gewebe vorhandene immunologische Komponente (Antigen oder sessiler Antikörper) muß ihre Reaktionsfähigkeit beibehalten.
2. Die Struktur und die zytologischen Einzelheiten des Gewebes dürfen nicht zerstört werden, Witting, Ch. (1977).

Bisher konnten aus diesen Gründen im allgemeinen nur unfixierte, gefrorene Gewebsproben für immunluoreszenzoptische Untersuchungen als optimal angesehen werden, Thoenes, G. H. (1973). Diese Tatsache brachte neben versandtechnischen Schwierigkeiten auch für die bioptische Bearbeitung teilweise erhebliche Probleme mit sich, Thoenes, G. H. (1973); Witting, Ch. (1977). Viele Autoren haben mit unterschiedlichen Methoden versucht, an formalin- oder alkoholfixierten Paraffinschnitten immunmorphologische Techniken anzuwenden: Brown, P. und Mitarb. (1974); Burns, J. (1975); Sainte-Marie, G. (1962); Taylor, C. R. und Burns, J. (1974); Watkins, W. B. und Evans, J. J. (1974); Nayak, N. C. und Sachadeva, R. (1975); Rag, M. B. und Desmel, V. J. (1975); Taylor, C. R. (1976); u. a.

Doch diese Untersuchungen, z. B. an formalinfixiertem Material, waren nach Witting, Ch. (1977) wegen der hohen unspezifischen Fluoreszenz der fixierten Schnitte so gut wie unmöglich. Huang, S. N. (1975) entwickelte 1975 eine Methode, um an paraffineingebetteten Leberproben immunfluoreszenzoptisch Australia-Antigen nachzuweisen. Es gelang ihm, durch Pronase-Behandlung die unspezifische Fluoreszenz auf ein Minimum zu beschränken, Huang, S. N. (1975).

Von den Forschern Denk, H. und Mitarb. (1976) und Witting, Ch. (1977) wurde diese Methode modifiziert und an verschiedenen Gewebearten angewandt. Witting, Ch. (1977) testet diese neue Technik an einer experimentell erzeugten GN an Mäusenieren. Er geht folgendermaßen vor: Die Tiere werden 48 Stunden nach der letzten Injektion von Anit-Maus-Gammaglobulin vom Kaninchen (Behring-Werke AG, Marburg/Lahn) getötet. Die eine Niere wird in flüssigem Stickstoff eingefroren und am Kryostat-Gefriermikrotom aufgearbeitet. Die andere Niere wird in 4%-igem gepuffertem Formalin fixiert und in typischer Weise in Paraffin eingebettet.

Nach Entparaffinierung der 4 µ dicken Schnitte durch Xylol werden die Schnitte mit 0,3%-igem Celloidin beschichtet und für 15 min mit 0,1%-iger Pronase (Typ VII, Sigma-Chemie, Neubiberg) bei Zimmertemperatur inkubiert. Diese Reaktion wird in eiskalter Phosphatpuffer (PHS, pH 7,45) über 60 min gestoppt. Danach werden die Schnitte wie auch die Kryostatschnitte mit 1:16 verdünntem FITC-gekoppeltem Anti-Maus-Gammaglobulin vom Kaninchen (Behring-Werke AG, Marburg/Lahn, Batch N^{o} 656 MolF/P 2,8) für 30 min inkubiert und nach mehrmaligem Waschen in PBS mit Glycerin-PBS eingedeckt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen von Witting, Ch. (1977) zeigen im fluoreszenzoptischen Bild der GN - abgesehen von unterschiedlichen Gewebeschrumpfungen - keinen Unterschied zwischen Kryostat- und Paraffinschnitten. Pronase-unbehandelte Paraffinschnitte sind wegen massiver unspezifischer Fluoreszenz nicht auswertbar, Witting, Ch. (1977). Derartige Untersuchungsergebnisse zeigen, daß mit dieser Methode fluoreszenzoptische Untersuchungen zur Diagnostik der GN auch an formalinfixiertem Nierengewebe möglich ist. Nach Witting, Ch. (1977) würde diese Untersuchungstechnik weniger Aufwand erfordern als die bisher angewandten fluoreszenzoptischen Methoden.
Thoenes, G. H. (1973) arbeitet mit unfixierten, tiefgeforenen Nierenbiopsiepräparaten. Die Punktionszylinder werden nach Thoenes, G. H. (1973) in einem als „Einbettungsmittel" oder Träger dienenden Leberstück (vom Kaninchen) in flüssigem Stickstoff oder mit einem CO_2-Schnellgefriergerät schockartig eingefroren. Ein blitzschnelles Einfrieren ist nach Thoenes, G. H. (1973) die Voraussetzung für eine gute Gewebserhaltung. Ca. 4-5 µ dicke Gefrierschnitte werden anschließend mit dem Kryostat-Gefriermikrotom hergestellt, Asamer, H. (1968); Thoenes, G. H. (1973). Nach Asamer, H. (1968) werden die Nierenpunktionszylinder in gesättigter Gelantine eingebettet und danach tiefgefroren und geschnitten. Nach der Technik von Thoenes, G. H. (1973) werden die Schnitte jetzt auf dem Objektträger aufgetaut, unter kühlem Luftstrom getrocknet, in gepufferter Kochsalzlösung gewässert, in der feuchten Kammer mit den verschiedenen fluoreszenzmarkierten Anti-Humanproteinseren inkubiert, erneut gut gewaschen und schließlich in gepuffertem NaCL/Glycerin-Gemisch eingedeckt.

Thoenes, G. H. (1973) schließt sofort die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung an: Dunkelfeldmikroskopie, Kondensor D 1, 20; Erregerfilter BG 12, Sperrfilter K 510.
Bei den unfixierten Präparaten nach Thoenes, G. H. (1973) handelt es sich nicht um Dauerpräparate, so daß eine fotografische Dokumentation positiver Befunde nötig ist. Für die verläßliche Beurteilung der Befunde ist die immunologische Qualität der verwendeten Antiseren von großer Bedeutung. Nach Thoenes, G. H. (1973) sind Antikörper-Titer und Antikörperspezifität für das jeweilige Immunglobulin, Fluoreszenz-Markierung der hochgereinigten Antiserum-IgG-Fraktion, Abtrennung von über- oder untermarkiertem Gammaglobulin sowie Freiheit von ungebundenem Farbstoff Voraussetzung. Thoenes, G. H. (1973) empfiehlt, einmal als gut befundene Antikörper-Chargen in größeren Mengen bei -70° C für längere Untersuchungszeiträume zur Verfügung zu halten, um eine gewisse Standardisierung zu gewährleisten. Thoenes, G. H. (1973) verwendet Fluoreszenz-IgG-Präparate aus eigener Herstellung und von der Firma Melog Springfield, Va, USA oder Hyland, Los Angeles, USA.
Die experimentelle Glomerulonephritisforschung hat unter Anwendung immunhistologischer Untersuchungstechniken zum besseren Verständnis von Ätiologie und Pathogenese glomerulärer Nierenerkrankungen geführt.

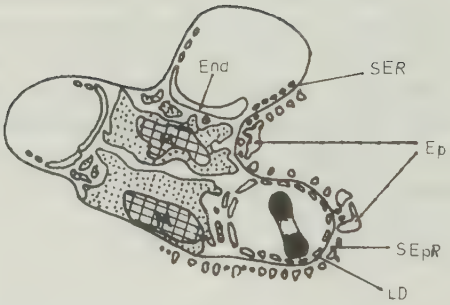
	Experimentelles Modell	Pathomechanismus	Humane Nephritis
I.	Injektion heterologer Basalmembranantikörper (Masugi-Nephritis, 1934)	Spezifische Reaktion heterologer Antikörper mit Nierenantigen des Wirtes (Basalmembran)	Goodpasture-Syndrom
II.	Injektion von heterologem Protein (Serumkrankheit)	Unspezifische Reaktion von Immunkomplexen am Glomerulusapparat	Poststreptokokkennephritis Nephritis bei LED
III.	Injektion von autologem Nierengewebe (Autoimmunnephritis)	Kombination von I. und II.	De novo-Nephritis nach Transplantation

Tab. 11: nach Maintz, J. und Mitarb. (1976)

Tabelle 11 zeigt die aus Tierexperimenten abgeleiteten immunologischen Entstehungsmechanismen von Nierenschädigungen, nach Maintz, J. und Mitarb. (1976).

Wird beispielsweise ein Kaninchen mit Basalmembranantigen einer Ratte immunisiert, so entwickelt es spezifische Antikörper der Klasse IgG gegen die Basalmembran der Ratte. Werden diese Antikörper wiederum der Ratte injiziert, so lagern sie sich der Basalmembran an und können hier mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-Kaninchen-IgG nachgewiesen werden. Die Antikörperaktivität ist also gegen antigene Determinanten gerichtet, die sich auf der glomerulären Basalmembran der Kapillarschlingen befinden, Thoenes, G. H. (1973). Es resultiert eine schwere progressive Glomerulonephritis (GN), diese wird Antibasalmembrannephritis genannt, Maintz, J. und Mitarb. (1976).
Der zweite Immunmechanismus, der eine Nierenschädigung hervorrufen kann, beruht auf der glomerulären Ablagerung von Komplexen aus prinzipiell ortsfremden Antigen und Antikörper, Thoenes, G. H. (1973), man spricht von der sogenannten Immunkomplexnephritis. Der Antigenanteil ist nicht nephrogenen Ursprungs, der Antikörper nicht primär gegen glomeruläre Strukturen gerichtet, Maintz, J. und Mitarb. (1976).
Die Immunmechanismen spielen sich an unterschiedlichen Feinstrukturen des Glomerulum ab.

Abb. 7 :
Glomerulumschlinge und die zugehörigen Mesangiumzellen. Elektronenoptische Schemazeichnung, nach Germuth und Rodriguez . Zeichenerklärung siehe Text



Im Zentrum eines Glomerulumläppchens befindet sich das Mesangium (M) mit den Mesangiumzellen. Die Glomerulumkapillare - mit Erythrozyt (E) in der Darstellung - schließt sich zur Peripherie hin an. Die Kapillare ist von porenhaltigen Endothelzellen ausgekleidet, die zur Lamina densa der Basalmembran hin (LD) den subendothelialen Raum (SER) abgrenzen. Die Basalmembran wird nach außen hin von der Epithelzelle (Ep) mit ihren Fußchenfortsätzen umhüllt, und sie bildet zur Basalmembran den subepithelialen Raum (SEpR). Zwischen Mesangium und subendothelialem Raum besteht eine gewisse Kontinuität, da hier die Lamina densa fehlt. Beide zusammen stellen das subendothelial-mesangiale System dar, nach Maintz, J. und Mitarb. (1976); Deetjen, P. (1973); Bohle, A. (1976 und 1975); Bohle, A. und Mitarb. (1969); Zollinger, H. U. (1971).

Die Antibasalmembrannephritis zeigt eine kontinuierliche lineare Fixierung des spezifischen Antikörpers an die Basalmembran. Immunhistologisch stellt sich daher eine lineare Fluoreszenz der gesamten Basalmembran dar, Maintz, J. und Mitarb. (1976), Thoenes, G. H. (1973); Vorlaender, K. O. (1976).
Bei der Immunkomplexnephritis finden sich dagegen feingranuläre Immundepots im subepithelialen oder mehr grobschollige im subendothelial- mesangialen Raum, Maintz, J. und Mitarb. (1976); Thoenes, G. H. (1973); Vorlaender, K. O. (1976). Durch diese Anordnung kommt es zu einer indirekten, aber von der linearen typisch unterschiedenen, nämlich diskontinuierlichen Darstellung des Verlaufs der Membran, Thoenes, G. H. (1973).
Die Art der Zusammensetzung der Immunkomplexe bestimmt wahrscheinlich ihren Ablagerungsort, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Bei Ablagerung der Immunkomplexe im subepithelialen Raum spricht man von der Klasse I der Immunkomplexnephritis; findet man sie dagegen im subendothelial-mesangialen Raum, so entspricht diese Immunkomplexnephritis der Klasse II, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Von Bedeutung dabei ist, daß die Pathogenität der Immunkomplexe dann größer ist, wenn der Antikörperanteil dem IgG oder IgM angehört, denn diese Antikörper verfügen über stärkere komplementaktivierende Eigenschaften als IgA, -D oder -E, Maintz, J. und Mitarb. (1976); Vorlaender, K. O. (1976).

Bei beiden bisher dargelegten Immunmechanismen wird die Schädigung der Niere weder durch den Antikörper noch durch Immunkomplexe hervorgerufen, sondern durch Reaktionen, die dieses immunologische Geschehen auszulösen in der Lage sind. Dabei spielt das Komplementsystem eine besondere Rolle, deren Aktivierung nach bestimmter Gesetzmäßigkeit abläuft, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); Maintz, J. und Mitarb. (1976); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Zum Beweis des Immunkomplexpathogeneseweges beim Menschen müßte die Kennzeichnung des beteiligten glomerulumfremden Antigens und die Spezifität des Antikörpers vorgenommen werden. Dies ist in einigen Fällen gelungen; Tabelle 12 gibt eine Zusammenstellung:

1. Exogene Antigene

a) Viren
- Hepatitis B
- Masern
- Oncorna
- Epstein-Barr

b) Bakterien
- Streptokokken
- Staphylokokken
- Enterokokken
- Pneumokokken
- Salmonellen
- Treponemen

c) Parasiten
- Plasmodium malariae falciparum
- Schistosoma mansoni
- Toxoplasma gondi

d) Medikamente
- D-Penicillamin
- Gold
- Heterologe Serumproteine
- Quecksilber

2. Endogene Antigene
- DNS, Zellkernantigene
- Kryoglobuline
- „Nierentubulus"-Antigen
- Thyreoglobulin
- Tumorantigene

Tab. 12: Antigene, die zur Immunkomplex-Glomerulonephritis führen können, nach Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978)

Die Mechanismen, die zur Bildung von Basalmembran-Antikörpern führen, sind unbekannt, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Diese Autorengruppe publizierte eine der jüngsten Arbeiten über die Bedeutung immunologischer Mechanismen in der Pathogenese renaler Erkrankungen; sie geben den modernen Stand unseres Wissens

über die Pathomechanismen bei Antibasalmembran-GN und bei Immunkomplex-GN wieder.
In Tabelle 13 ist eine der möglichen Einteilungen menschlicher Glomerulonephritiden nach immunologischen Kriterien wiedergegeben:

I. Immunkomplexnephritiden
   A. Glomerulonephritiden mit bekannter Ätiologie:
      Nephritis nach Streptokokkeninfektionen,
      bei Serumkrankheit,
      bei Malaria
      bei bakteriellen Infektionen:
         Endokarditis, Lues, Pneumokokken- und Staphylokokken-Infektionen (zum Beispiel von Kunststoffkathetern),
         Typhus,
      bei Virus-Infektionen:
         Mumps, Varizellen, Vaccinia, Adenoviren, Ebstein-Barr-Viren, Echo 9, Coxsackie B 3,
      bei persistirendem Hepatitis-B-Antigen
   B. Glomerulonephritiden im Rahmen von Systemerkrankungen:
      Nephritis bei Lupus erythematodes,
      bei M. Schoenlein-Henoch
      Periarteriitis nodosa,
      Kryoglobulinämie,
      maligne Tumoren (Bronchialkarzinom, Morbus Hodgkin, Lymphsarkom u. a.)
   C. Glomerulonephritiden unbekannter Ätiologie:
      membranöse Glomerulonephritis,
      proliferate Glomerulonephritis,
      membranoproliferative, hypokomplementämische Glomerulonephritis
      fokal-sklerosierende Glomerulonephritis
      IgA-IgG-Nephropathie (Berger)

II. Antibasalmembrannephritiden
   A. Goodpasture-Syndrom
   B. rasch progressive (perakute) Glomerulonephritiden in den meisten Fällen
   C. in Ausnahmefällen:
      Lupusnephritis, Poststreptokokkennephritis,

chronische Glomerulonephritis

III. Interstitielle Nephritis (TBM-Nephritis)
A. spontan
B. nach Medikamenten?

Tab. 13: Einteilung der humanen Nephritiden nach immunologischen Kriterien,
nach Maintz, J. und Mitarb. (1976)

Wenn man, wie im bisher Gesagten, die Immunfluoreszenz-Methode unter rein kausalen Gesichtspunkten verwendet, so ergibt sich jene begrenzt aufschlußreiche pathogenetische Zweiteilung: Antibasalmembran-Nephritis - Immunkomplex-Nephritis. Nach Thoenes, G. H. (1973) stehen jedoch dem Organismus ganz offensichtlich für ein prinzipiell gleiches pathogenetisches Prinzip unterschiedliche Reaktionsformen zur Verfügung. Unklar ist nach Thoenes, G. H. (1973) im Einzelfalle meistens, worin der Anlaß für das eine oder das andere Reaktionsmuster zu suchen ist. Dokumentiert finden sich diese Reaktionsmuster in den jeweils relativ typischen pathomorphologischen Veränderungen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß sich immunologisches Reaktionsprodukt und morphologisches Substrat wechselseitig bedingen, Thoenes, G. H. (1973). Nach Thoenes, G. H. (1973) jedenfalls ergeben sich für den Immunhistologen bestimmte „semimorphologische" Erscheinungsformen der GN, die im folgenden bei der Darstellung besonders prägnanter und wichtiger humaner Nephritiden beschrieben werden sollen.

5.2.1. Poststreptokokkennephritis

Wichtigstes Beispiel einer Immunkomplexnephritis bekannter Ätiologie ist die Poststreptokokken-Nephritis - histologisch zu den proliferaten Formen gehörend -, die im Experiment der Nephritis bei akuter Serumkrankheit vergleichbar ist, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Immunhistologisch zählt diese Nephritisform nach Thoenes, G. H. (1973) zum akut proliferaten Typ. Man beobachtet eine granuläre Ablagerung von IgG und Komplement (C 3) - häufig IgM sowie gelegentlich IgA und Fibrinogen - im subepithelialen Raum der Glomerulumkapillare, wobei das Nebeneinander grober und feiner Immundeposaten typisch ist, Maintz, J. und Mitarb. (1976);

Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Die gröberen granulären Anfärbemuster werden als „humps" bezeichnet, Thoenes, G. H. (1973). Analysen von Niereneluaten ergaben Streptokokkenantigen im Immunkomplex, wodurch die immunologische Natur dieser Nephritisform gesichert ist, Maintz, J. und Mitarb. (1976).
In seltenen Fällen tritt in der akuten Phase einer Streptokokkeninfektion eine Antibasalmembrannephritis auf, Thoenes, G. H. (1973); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Bei dieser Form wird u. a. eine Antigenverwandtschaft zwischen Strukturproteinen der Basalmembran und Streptokokkenantigen angenommen, Lubec, G. (1977); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Die Immunantwort auf die Infektion würde hierbei gleichzeitig eine autoantikörperbedingte Krankheit bedeuten, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Krzymanski, M. und Mitarb. (1975) beschreiben humorale und zelluläre Allergie gegen Streptokokkenmembranantigene bei Patienten mit GN. Einzelheiten über humorale und zelluläre Allergie gegen die Glomerulumbasalmembran bei Kindern mit glomerulären Nierenerkrankungen sind dem Bericht von Lubec, G. (1977) zu entnehmen. Maintz, J. und Mitarb. (1976) können Antibasalnephritiden nachweisen, die nur diskrete klinische Symptome aufweisen und histologisch geringgradig sklerosierende Veränderungen zeigen. Nach Baldwin, D. S. und Mitarb. (1974) ist ein Übergang von einer Immunkomplexnephritis innerhalb des ersten Jahres in eine Antibasalmembrannephritis in der Folgezeit evident. Dieser Übergang kann von Maintz, J. und Mitarb. (1976) bestätigt werden. Demnach sind die gering ausgeprägten Antibasalnephritiden als persistierende Autoimmunnephritiden nach einer durch Streptokokken bedingten Immunkomplexnephritis aufzufassen, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu der von anderen Autoren vertretenen Auffassung, daß bis zu 90 % der Poststreptokokkennephritiden ausheilen, Liebermann, E. und Donnell, G. N. (1969). Jedoch hat die Poststreptokokkennephritis im Kindesalter eine bessere Prognose als bei Erwachsenen, sie ist bei typischer Erkrankung und unkompliziertem Verlauf insgesamt gut, Brandis, M. und Mitarb. (1976); Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977).
Es ist allerdings die perakute GN zu erwähnen, die klinisch und pathologisch als Sonderform der GN differenziert wurde, Brandis, M. und Mitarb. (1976); u. a. kann eine vorausgegangene Streptokokkeninfektion Ursache dieser schweren Glomerulonephritisform sein;

es werden jedoch weitere Ursachen unterschieden, die dieser Erkrankung zugrunde liegen können, von denen im Kindesalter nur einige vorkommen, siehe bei Brandis, P. und Mitarb. (1976). Immunhistologisch zählt auch diese GN-Form zum sogenannten akut-proliferativen Typ, Thoenes, G. H. (1973). Nach Brandis, P. und Mitarb. (1976) imponieren vor allem ausgeprägte mesangiale Fibrinablagerungen mit Aussparung des proliferierten Kapselepithels, daneben findet sich eine grobgranuläre kapilläre Komplementablagerung (C'3). Die günstige Prognose der akuten Poststreptokokkennephritis im Kindesalter korrespondiert zu der relativ günstigen Verlaufsform der perakuten GN nach Streptokokkeninfektionen gegenüber anderen Ursachen, Brandis, M. und Mitarb. (1976).

5.2.2. IgA/IgG-Nephropathie - „Berger"-Glomerulonephritis -

Eine zweite Gruppe von glomerulären Erkrankungen geht charakteristischer Weise mit rezidivierender Hämaturie einher, die im Gegensatz zur akuten GN gleichzeitig mit dem Infekt, d. h. parainfektiös und nicht postinfektiös auftritt, Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977), Häufig werden nach den genannten Autoren auch Makrohämaturien beobachtet, die im infektionsfreien Intervall als Mikrohämaturie persistieren.

Diese sogenannte IgA/IgG-Nephropathie wurde erstmals von Berger, J. 1969 erkannt und beschrieben, Maintz, J. und Mitarb. (1976); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Die endgültige Diagnose kann nur aus der Nierenbiopsie gestellt werden, wobei das Gewebe licht- und immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht werden muß, Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977). Am häufigsten trifft man nach Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977) fokale bzw. fokal-segmental betonte Glomerulonephritiden vom (mesangial)-proliferativen Typ, meist mit auffälliger Matrixvermehrung. Fast ebenso häufig kommen aber Minimalglomerulonephritiden vor, bei denen die Glomerula nur eine unscheinbare („minimale") Mesangiumverdickung erkennen lassen, Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977). Sehr häufig liegt hier eine IgA-IgG-Nephritis vor, Thoenes, G. H. (1973); Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977) - bei der praktisch alle Glomerula eine kräftige mesangiale IgA-IgG-Ablagerung aufweisen, Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977). Das immunpathologische Bild ist daher besonders typisch und durch die starke Anfärbung auf IgA charakterisiert, Thoenes, G. H. (1973).

IgA (sehr oft dann gemeinsam mit IgG) hat nach Thoenes, G. H. (1973) eine besondere Präferenz zum Mesangium und man sieht es kaum an anderer Lokalisation.
Nach heutiger Ansicht, Maintz, J. und Mitarb. (1976) besitzt das Mesangium auf Grund der besonderen anatomischen Struktur und funktionellen Eingliederung in den glomerulären Blutstrom eine hohe Phagozytosekapazität und nimmt somit RHS-Funktionen (retikulo-histiozytäres System) wahr. Nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) können Immunglobulinaggregate und Immunkomplexe abhängig von Quantität und Qualität isoliert in das Mesangium aufgenommen werden, ohne daß die Basalmembran und das Endothel geschädigt werden. Diese Voraussetzung dürfte nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) bei der IgA-IgG-Nephropathie gegeben sein, da Immunglobuline mit der Dominanz von IgA isoliert im Mesangium nachgewiesen werden können, Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977). Auf diese Weise erklärt sich nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) auch der jahrelange Verlauf dieser Erkrankung mit geringer Symptomatik, zumal IgA nur in geringem Maße zur Komplementaktivierung mit den daraus resultierenden zytotoxischen Reaktionen fähig ist.
Dagegen äußern Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978) die Vermutung, daß die Ablagerung von IgA bei dieser Nephritisform vielleicht eine Immunantwort gegen virale Antigene ist, die vorwiegend mit einer IgA-Antikörperproduktion einhergeht.
Die Prognose dieser als chronisch anzusehenden GN ist relativ gut, Thoenes, G. H. (1973); schwere Verlaufsformen einer diffusen mesangial-proliferaten GN sind nach Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977) im Kindesalter selten.
Nur die Immunhistologie erkennt diese Form der Nephritis am schnellsten und auch sichersten, Thoenes, G. H. (1973); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Gerade bei den Minimalglomerulitiden, bei denen der lichtmikroskopische Befund oft an der Grenze zur Norm steht und daher nur begrenzt aussagefähig ist, ist nach Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977) die parallel durchgeführte immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung absolute Voraussetzung für eine eindeutige Diagnosestellung. Dies gilt auch für Minimalglomerulitiden mit andersartigen (nicht-IgA) Immunfluoreszenzbefunden, Brodehl, J. und Thoenes, W. (1977).

Differentialdiagnostisch ist bei mesangialen IgA-Ablagerungen immer an die Frühform der Lupusnephritis oder an eine Nephritis bei Purpura Schoenlein-Hennoch zu denken, Maintz, J. und Mitarb. (1976).

5.2.3. Stickler-Syndrom

Stickler, G. B. beschrieb 1968 eine diffuse GN im Zusammenhang mit einem durch Staphylococcus albus infizierten Kunststoffkatheter nach Ventrikulokardiotomie (Pudenz-Katheter), nach Maintz, J. und Mitarb. (1976). Dieselben Autoren stellen durch immunhistologische Untersuchungen in derartigen Fällen eine ausgeprägte Immunfluoreszenznephritis fest, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Die Immunantwort richtet sich nach den Autoren wahrscheinlich gegen Bakterientoxine, die in den Kreislauf gelangen.
Nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) beobachten Macheret, H. und Mitarb. (1974) bei einem Patienten mit einem Hydrocephalusventil vom Typ Spitz-Holter eine Staphylococcus albus-Bakteriämie mit gleichzeitig auftretender IgG/IgM-Kryoglobulinämie. Die von Maintz, J. und Mitarb. (1976) genannten Autoren wiesen außer einer Immunkomplexnephritis Immunkomplexablagerungen in den alveolären Septen der Lunge und den kleinen und mittleren Lungenarterien nach.

5.2.4. Glomerulonephritis bei persistierendem Hepatitis-B-Antigen

Nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) berichten Combes, B. und Mitarb. (1971) zum ersten Mal über das Auftreten einer membranösen GN bei einem Patienten mit persistierendem Hepatitis-B-Antigen nach Transfusionshepatitis. Bei Hepatitis-Antigenämie kann es nach Maintz, J. und Mitarb. (1976), die die Befunde von Combes, B. und Mitarb. (1971) bestätigen können, bei Antigenüberschuß infolge begrenzter Antikörperbildung zur Antigenpersistenz kommen. Dies führt zum Auftreten von zirkulierenden löslichen Immunkomplexen, die sich in den epithelwärts gelegenen Partien der Basalmembran ablagern und immunhistologisch das Bild der membranösen GN mit perlschnurartig angeordneten granulären Immundepots aus IgG und Komplement hervorrufen, Maintz, J. und Mitarb. (1976).

Die pathogenetische Bedeutung des Hepatitis-B-Antigens für diese Form der membranösen GN konnte durch die Darstellung von Hepatitis-B-Antigen mittels FITC-markiertem Hepatitis-B-Antikörper in den Immunkomplexen wahrscheinlich gemacht werden, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Es gelang ferner, in den zirkulierenden Immunkomplexen Hepatitis-B-Antigen nachzuweisen, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Auf Grund von Untersuchungen, u. a. von Martini, G. A. und Mitarb. (1972) scheint es möglich zu sein, daß bei persistierendem Hepatitis-B-Antigen außer der membranösen GN eine Immunkomplexvaskulitis im Sinne von Periarteriitis nodosa auftreten kann.

5.2.5. Membranöse Glomerulonephritis

Die membranöse GN zählt man ebenfalls zu den Immunkomplexnephritiden, Maintz, J. und Mitarb. (1976), obschon es kaum gelingt, zirkulierende Immunkomplexe nachzuweisen und im Glomerulum entzündliche Veränderungen fehlen, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Die Immundepots finden sich im Frühstadium der Erkrankung ausschließlich im subepithelialen Raum der Basalmembran in regelmäßig-perlschnurartiger Anordnung, Thoenes, G. H. (1973); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Die Natur dieser Immundepots ist bei der spontan auftretenden Form bisher noch nicht identifiziert, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Beim progredienten Verlauf der Erkrankung wandern die Immundepots vom subepithelialen Raum in die Basalmembran ein und erfahren eine massive Zunahme ihres Durchmessers, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Für die Immunhistologie hat dieser membranöse bzw. nach Thoenes, G. H. (1973), perimembranöse GN-Typ besondere Bedeutung: Nur mit Hilfe der Immunfluoreszenz - und der Elektronenmikroskopie, Maintz, J. und Mitarb. (1976) - kann das Frühstadium erfaßt werden, solange die Immunkomplexe noch in kleinen Depots unterhalb der Füßchenfortsätze der Epithelzellen abgelagert sind, Thoenes, G. H. (1973); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Erst wenn die Membranverdickung einsetzt, vermag die Lichtmikroskopie die Diagnose zu stellen, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Es ist aber klinisch wichtig, die Frühform einer membranösen GN von membranösen Minimalveränderungen, besonders von Lipoidnephrose und akuter membranöser GN abzutrennen, da die Prognose unter-

schiedlich ist, Thoenes, G. H. (1973); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Dies ist dadurch gut möglich, daß die Lipoidnephrosen bzw. die sogenannten histologischen Minimalveränderungen immer negative immunhistologische Befunde bieten, Thoenes, G. H. (1973); Maintz, J. und Mitarb. (1976), woraus allgemein auf die nicht-immunologische Natur der Membranerkrankung geschlossen wurde, Thoenes, G. H. (1973). Nach Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978) wird eine pathologische T-Zell-Funktion diskutiert. Möglicherweise läßt sich die Prognose der membranösen GN bessern, wenn sie im Frühstadium immunsupressiv behandelt wird, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Neben der spontan auftretenden membranösen GN scheint in wenigen Fällen die Krankheitsursache bekannt zu sein. Dies gilt nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) für die oben diskutierte Nephritis bei persistierendem Hepatitis-B-Antigen, für einige Fälle von Penicillamin-Nephropathie, für die Goldnephrose, die membranöse GN bei Morbus Boeck, für seltene Fälle der Lupusnephritis sowie für die Nephritis bei malignen Tumoren. Übergänge beispielsweise von einer diffus proliferaten in eine membranöse GN, ferner einer membranösen in eine Antibasalmembrannephritis wurden nach Maintz, J. und Mitarb. von verschiedenen Autoren beschrieben.

5.2.6. Herdförmige glomeruläre Sklerosen

Im Rahmen der sogenannten Minimalveränderungen wurden herdförmige glomeruläre Sklerosen beschrieben, Thoenes, G. H. (1973). Die Immunhistologie bietet dazu ein typisches Bild herdförmig positiver neben negativen glomerulären Arealen mit bevorzugt IgM-Ablagerungen, Thoenes, G. H. (1973). Die pathogenetischen Zusammenhänge dieses immunologischen Phänomens sind nach Thoenes, G. H. (1973) noch nicht bekannt; der Autor vermutet, daß diese IgM-Ablagerungen unspezifisch sind und ohne immunologischen Grund. Abgesehen von den fokalen, grob sichtbaren Veränderungen wurden auch an den übrigen, lichtmikroskopisch unauffälligen Glomerula elektronenoptisch sichtbare Membranveränderungen beschrieben, Thoenes, G. H. (1973). Thoenes, G. H. (1973) hebt daher hervor, daß man immunhistologisch besonders bei sogenannten Lipoidnephrosen des älteren Jugendlichen mit histologischen Minimalveränderungen gelegentlich auffällige lineare „Kontrastierungen" der glomerulären

Basalmembran beobachtet. Diese Befunde sind nach Thoenes, G. H. (1973) IgG-spezifisch und meist nur mit sehr guten Antiseren nachweisbar. Ein Komplementnachweis ist nicht immer möglich und eine immunologische Interpretation nach Thoenes, G. H. (1973) von daher fragwürdig. Im Hinblick auf die noch ungeklärte Pathogenese der Minimalveränderungen sollen diese immunhistologischen Befunde nach Thoenes, G. H. (1973) nicht unerwähnt bleiben.

5.2.7. Membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN)
Die membranoproliferative GN (weiterhin: MPGN) tritt gehäuft bei Jugendlichen und Kindern auf, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977). Eine Reihe von immunologischen Charakteristika unterstreichen die Sonderstellung dieser chronisch verlaufenden GN. So findet sich eine oft über lange Perioden des Krankheitsverlaufs persistierende Hypokomplementämie, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977), die besonders auf eine Depression der dritten Komplementkomponente (C 3) beruht, während die frühwirkenden Komplementfaktoren (C 1, C 2, C 4) im Normbereich liegen, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Die Ursache dieser Hypokomplementämie kann bei einem Teil der Patienten auf die Wirkung eines komplementaktivierenden Serumfaktors, des C3-Nephritis-Faktors (C3NeF) zurückgeführt werden, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Immunhistologisch lassen sich nahezu regelmäßig granuläre Ablagerungen von C 3 und den nachfolgenden Komplement-Komponenten (C 5 - C 9) innerhalb des Mesangiums und an der Basalmembran nachweisen, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977). Properdin-Niederschläge werden oft in einem ähnlichen Verteilungsmuster angetroffen, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Bei etwa zwei Drittel der Patienten mit lichtoptisch diagnostizierter MPGN finden sich auch die frühen Komplement-Komponenten C 1 q und C 4, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); bei über 50 % Ablagerungen von IgG, seltener werden IgM-, IgA- oder Fibrin-Niederschläge nachgewiesen, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); Bohle, A. (1976); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978). Gegenüber den C 3- und Properdin-Niederschlägen erscheinen die Immunglobulinablagerungen zumeist schwächer ausgeprägt, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977).

Eine Zusammenfassung über Häufigkeit der Ig- und Komplement-Ablagerungen aus Arbeiten verschiedener Autoren geben Seelig, H.P. und Seelig, R. (1977). Die Topographie elektronenoptisch darstellbarer Ablagerungen innerhalb der Glomerula erlaubt eine Unterteilung der MPGN in Subgruppen, die auch durch unterschiedliche immuhistologische und immunbiologische Merkmale imponieren. Im Rahmen dieser Arbeit seien nur die unterschiedlichen immunhistologischen Bilder dieser feinstrukturellen Differnzierungen erwähnt.

1. Bei der MPGN mit subendothelialen Ablagerungen - entspricht nach Anders, D. (1977) der idiopathischen MPGN, Typ I - finden sich neben granulären Niederschlägen von C 3 und Properdin auch Ablagerungen oder Depots von C 1q, C 4 und IgG an der Basalmembran sowie innerhalb des Mesangiums, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978).
   Im Spätstadium können die C 3- und Properdin-Niederschläge überwiegen und Immunglobuline nicht mehr nachweisbar sein, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977).
2. Die MPGN mit elektronendichten intramembranösen Ablagerungen wird nach Anders, D. (1977) als Typ II und Typ III differenziert und nach Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977) bei 30 - 50 % der Patienten gefunden. Immunhistologisch finden sich hier granuläre intramesangiale sowie granuläre konfluierte, oft „linear" erscheinende C 3-Niederschläge an der Basalmembran, Bohle, A. (1976); Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977). Ablagerungen von Faktor B wurden nach Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977) in entsprechender Lokalisation gefunden, Properdin-Niederschläge sind nicht regelmäßig vorhanden, Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977). Komplement-Ablagerungen finden sich auch in der Bowmanschen Kapsel und in den tubulären Basalmembranen, Bohle, A. (1976), Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977). Nach Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977) scheinen im Gegensatz zu der MPGN mit subendothelialen Depots Immunglobulin-Niederschläge, besonders IgG, bei dieser Form im allgemeinen nicht vorzukommen.

Hinsichtlich der immunpathogenetischen Zusammenhänge dieser Nephritisform sei auf die Spezialliteratur, insbesondere auf die Arbeiten von Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977) und Bohle, A. (1976) verwiesen.
Von Interesse ist eine Kasuistik von Hellwege, H. H. und Mitarb. (1976), die das gleichzeitige Vorkommen einer Colitis ulcerosa mit einer hypokomplementämischen MPGN bei einem 5 1/2 Jahre alten Mädchen beschreibt. Diese Koinzidenz von Colitis ulcerosa und chronischer Immunkomplexnephritis ist selten und wurde nach Hellwege, H. H. und Mitarb. (1976) zuvor noch nicht beschrieben. Auf Grund des mehrfachen Nachweises von freiem Colon-Antigen im Blut könnte nach Hellwege, H. H. und Mitarb. (1976) durch die Freisetzung von antigenen Gewebsbestandteilen des Darmes die Bildung nephritisinduzierender Immunkomplexe ermöglicht worden sein. Allerdings gelang den Autoren nicht der Nachweis des Colon-Antigens in den Immunkomplexen innerhalb der erhaltenen Glomerula der Schrumpfnieren der verstorbenen Patientin; und damit fehlt der entscheidende Beweis für die gegebene Interpretation. Bei rechtzeitiger Klärung dieser von Hellwege, H. H. und Mitarb. (1976) vermuteten Immungenese hätte die Beendigung der Antigenfreisetzung durch Colektomie Aussicht auf Besserung der Nephritis bieten können, Hellwege, H. H. und Mitarb. (1976).

5.2.8. Renopulmonales Syndrom - Goodpasture-Syndrom -
Bei klinischer Manifestation einer glomerulären Nierenerkrankung und pulmonaler Hämorrhagie wird vom Goodpasture-Syndrom gesprochen. Dieses Syndrom - 1919 erstmals beschrieben - zählt heute ebenfalls zu den immunologisch bedingten Nierenerkrankungen, nachdem Autoantikörper gegen die Basalmembran der Niere, sowohl im Blut zierkulierend als auch an die glomeruläre Basalmembran gebunden - nachgewiesen werden konnten, Maintz, J. und Mitarb. (1976).
Bei der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung finden sich zwei (Plasmaprotein-) Einlagerungsmuster im Glomerulum:
1. durch die lineare Nachzeichnung des Schlingenbündels das Immunfluoreszenzphänomen vom Typ der Anti-Glomerulum-Basalmembran Antikörper, Höfer, W. und und Misgeld, V. (1977); (lineare Ablagerungen von IgG und meist C 3 im Sinne der Anti-basalmembranneprhitis, Maintz, J. und Mitarb. (1976).

2. auf Grund von diskontinuierlichen, feingranulären, den Glomerulumstrukturen zugeordneten Depots das Immunfluoreszenzphänomen vom Typ der Immunkomplexdepots, gleich granuläre IgG-Präzipitationen Höfer, W. und Misgeld, V. (1977).

Bei beiden immunhistologischen Typen gelingt nach Höfer, W. und Misgeld, V. (1977) zudem ein glomerulärer und ein extraglomerlärer Fibrinnachweis, Asamer, H. und Mitarb. (1975).
Durch Überschichtung von Normal-Human-Nierengewebe mit Patientenserum ist es mittels der indirekten Immunfluoreszenz möglich, (zirkulierende) Anti-Glomerulum-Basalmembranantikörper nachzuweisen, Höfer, W. und Misgeld, V. (1977). Diese Befunde jedoch korrespondieren nach den ebengenannten Autoren nicht immer mit den Ergebnissen der direkten Immunfluoreszenzuntersuchung.

Die immunhistologischen Befunde an der Lunge mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztestes erhoben, sind durch den Nachweis von alveolär membranartig sowie kapillär thrombenartig abgelagertem fibrinartigem Material gekennzeichnet, Höfer, W. und Misgeld, V. (1977). Pulmonale Immunglobulin- und/oder Komplementpräzipitate sind den Autoren nicht aufgefallen, Höfer, W. und Misgeld, V. (1977). Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen können im Serum von Patienten mit Goodpasture-Syndrom keine zirkuliernden Antikörper gegen Human-Normal- sowie gegen das patienteneigene Lungengewebe nachweisen, Höfer, W. und Misgeld, V. (1977); Asamer, H. und Mitarb. (1975).
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Goodpasture-Syndrom durch die Immunfluoreszenz bereits in einem Stadium wahrscheinlich gemacht werden kann, in dem die Klinik nur passagere pulmonale Veränderungen gesehen hat, Thoenes, G. H. (1973).
Das repulmonale Syndrom ist insgesamt selten, der Verlauf des Leidens durchweg delitär, Maintz, J. und Mitarb. (1976); Höfer, W. und Misgeld, V. (1977). Über Ätiologie und Pathogenese bestehen in der Literatur unterschiedliche Hypothesen, es wird auf die entsprechende Literatur verwiesen.

5.2.9. Interstitielle Nephritis

Die immunkomplexbedingten Nierenschädigungen sind nicht immer ausschließlich auf glomeruläre Strukturen beschränkt. Doch es

ist bisher wenig über die Beteiligung des Tubulussystems im Rahmen der GN bekannt. Tierexperimentelle Studien weisen auf die mögliche Bedeutung zellulärer Autoaggressionsmechanismen in der Entstehung bestimmter interstitieller Nephritiden hin, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Maintz, J. und Mitarb. (1976). Jüngste Berichte weisen darauf hin, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978), daß bei Patienten mit lange persistierenden hohen Immunkomplexkonzentrationen (Patienten mit systematisiertem LE oder nach Nierentransplantation) Immunaggregate häufig auch im Interstitium beobachtet werden können. Die Immunkomplexe werden dabei an die Tubulusbasalmembran, die Kapillarwände sowie an interstitielle Gewebsstrukturen gebunden, wo sie wie bei glomerulärer Abbindung zur Entzündung und Fibrose der betroffenen Gewebsareale führen, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Maintz, J. und Mitarb. (1976).
Es ist noch nicht im einzelnen bekannt, inwieweit die medikamenteninduzierten interstitiellen Nephritiden immunologischer Genese sind, Maintz, J. und Mitarb. (1976). So sind bei der zahlenmäßig größten Gruppe, den phenazetinbedingten interstitiellen Nephritiden, hyperergische Reaktionen bisher nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) nicht bekannt geworden. Bei einigen seltenen Fällen von methicillinbedingten interstitiellen Nephritiden allerdings konnten tubuläre Basalmembran-Antikörper nachgewiesen werden, Maintz, J. und Mitarb. (1976). Allergische Mechanismen werden bei ampicillin-, phenazon- und diuretikabedingten interstitiellen Nephritiden vermutet, Maintz, J. und Mitarb. (1976); hierfür spricht u.a. die Beobachtung erhöhter IgE-Spiegel im Serum einiger Patienten dieser Erkankungen, Maintz, J. und Mitarb. (1976), woraus sich nach diesen Autoren die Hypothese ableitet, daß Reagin-Antigen-Komplexe für die interstitielle Nierenschädigung verantwortlich sein könnten.

5.2.10. Lupusnephritis

Der Lupus erythematodes disseminatus (weiterhin:LED)ist auch im kindlich-jugendlichen Alter neben der chronischen Polyarthritis wohl die klinisch wichtigste Kollagenkrankheit, Federlin, K. (1976). Vom pathogenetischen Prinzip her stellt diese Erkrankung das typische Beispiel einer Immunkomplexkrankheit dar,

denn zirkulierende Immunkomplexe spielen pathogenetisch die entscheidende Rolle, McCluskey, T. R. und Mitarb. (1966). Je nach Krankheitsaktivität werden besonders die Gefäßabschnitte der verschiedensten Organe in den Krankheitsprozeß einbezogen; Immunkomplexvaskulitis mit Organschädigung sind die Folge, Federlin, K. (1976). Hieraus wird verständlich, daß die Niere mit hoher Durchblutungsrate und zentraler Filterfunktion beim LED grundsätzlich die typischen morphologischen Veränderungen aufweist, Federlin, K. (1976); Henningsen, B. und Mitarb. (1976). Es kommt zur sogenannten Lupusnephritis, die in einem hohen Prozentsatz Krankheitsbild und Prognose bestimmt, Federlin, K. (1976).

Entsprechend den einzelnen Sturktureinheiten des Glomerulum lassen sich nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) immunhistologisch vier Ablagerungsmuster nachweisen:

Die Autoren finden bei einigen Patienten isolierte Immunglobulinniederschläge im Mesangium (1); bei anderen Patienten finden sie das Bild einer mesangialendothelialen Fluoreszenz (2); bei einem dritten Patientenkollektiv zeigen sich nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) nur epitheliale (3), z. T. sehr grobe Immunkomplexniederschläge, und bei einem vierten Kollektiv schließlich läßt sich der immunhistologische Befund als gering ausgeprägte Antibasalmembrannephritis (4) einordnen.

Allein in einem Fall bietet sich bei Henningsen, B. und Mitarb. (1976) das Bild einer membranösen GN. Es zeigt sich nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) außer bei den Fällen mit Antibasalmembrannephritis eine Dominanz von Komplement C 3.

Libit, S. A. und Mitarb. (1976) berichten auf Grund von vergleichenden immunhistologischen, licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen über das Vorkommen einer extramembranösen GN (extra-membranous glomerulonephritis, MGN) bei Kindern im Zusammenhang mit systemisierten LE (weiterhin SLE) und nephrotischem Syndrom.

Immunhistologisch finden sich nach Libit, S. A. und Mitarb. (1976) IgG-, teilweise auch IgM-, IgA- und Komplement-Ablagerungen entlang den Kapillarwänden des Glomerulums. Dieser immunhistologische Befund ist nach Libit, S. A. und Mitarb. (1976) von großer Bedeu-

tung für die Differentialdiagnose des idiopathischen nephrotischen Syndroms im Kindesalter, bei dem diese Immunphänomene nicht nachzuweisen sind.

Die klinische Symptomatik ist bei den vier oben erwähnten immunhistologischen Nephritisbefunden nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) unterschiedlich:

(1) Die Patienten mit isolierter Mesangiumbeteiligung zeigen nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) nur selten pathologische Urinbefunde, die histologische Nierenuntersuchung ist meist unauffällig.

(2) In dem Kollektiv mit epithelialen Immunkomplexniederschlägen finden sich nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) in allen Fällen nephrotisches Syndrom, Erythrozyturie, Hypertonie und Übergang in eine Niereninsuffizienz. Histologisch herrschen diffuse proliferative und nekrotisierende Veränderungen vor, Henningsen, B. und Mitarb. (1976).

(3) Das Patientenkollektiv mit Antibasalmembrannephritis bzw.

(4) membranöser GN zeigt klinisch ein remittierendes nephrotisches Syndrom ohne Nierenfunktionseinschränkung, Henningsen, B. und Mitarb. (1976).

In bezug auf die Krankheitsdauer ergeben sich nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) besonders in der ersten Gruppe lange Verlaufszeiten. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese von der Schutzfunktion des Mesangiums, s. o. Maintz, J. und Mitarb. (1976), denn man kann nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) davon ausgehen, daß die Immunglobulinablagerungen bereits Jahre vor der ersten Nierenbiopsie vorlagen. Nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) sind Übergänge von einer immunhistologischen Form in die andere nicht wahrscheinlich; dagegen scheint die Intensität der Immunglobulinniederschläge mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren, Henningsen, B. und Mitarb. (1976). Für die Lokalisation der Immunkomplexe halten Henningsen, B. und Mitarb. (1976); Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978) Qualität, Größe und Menge für entscheidend. Von Bedeutung scheint dabei auch die Art der beteiligten Antigene zu sein, die sehr multivalent sein können, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Federlin, K. (1976); McCluskey, R. T. und Mitarb. (1966); Bohle, A. (1976); Libit, S. A. und Mitarb. (1976).

Ferner sind offenbar verschiedene IgG-Subgruppen mit unterschiedlichen Komplementaktivierungseigenschaften an der Immunkomplexbildung beteiligt, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Henningsen, B. und Mitarb. (1976).
Federlin, K. (1976) diagnostiziert immunhistologisch in der Basalmembran oder aber auch subendothelial bzw. subepithelial körnigschollige Ablagerungen, die IgG-, IgM- und Komplementbestandteile (C 3, C 1q) enthalten, siehe auch Helmke, K. und Mitarb.(1974); Kalden, J. R. (1975); Hoppe, I. (1977); Cohen, S.A. und Mitarb. (1971). In gleicher Lokalisation kann auch DNS nachgewiesen werden, Federlin, K. (1976), deren Bedeutung für die Serologie weiter unten ausführlich beschrieben wird.
Die Prognose einer Lupusnephritis läßt sich allein aus dem immunhistologischen Bild nicht ableiten, Helmke, K. und Mitarb. (1974); Henningsen, B. und Mitarb. (1976). Im Zusammenhang mit den morphologischen Veränderungen und den klinischen Angaben ist die Immunfluoreszenz jedoch eine wertvolle Ergänzung des Untersuchungsspektrums, Helmke, K. und Mitarb. (1974); Hoppe, I. (1977); Henningsen, B. und Mitab. (1976).
Es sei noch hinzugefügt, daß der medikamenteninduzierte LE die gleichen Veränderungen an der Niere zeigt wie die spontan auftretende Erkrankung, Henningsen, B. und Mitarb. (1976).

Von Maas, D. und Schubothe, H. (1973) wurde das Krankheitsbild des Pseudo-LE-Syndroms beschrieben, das dem LED hinsichtlich der klinischen Symptomatik in vielen Zügen ähnelt, serologisch aber durch das Vorhandensein von antimitochondrialen Antikörpern und dem Fehlen antinukleärer Faktoren charakterisiert ist, Kaboth, U. und Mitarb. (1977); Maintz, J. und Mitarb. (1975). Es handelt sich nach Maintz, J. und Mitarb. (1975) mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls um eine Immunkomplexkrankheit mit Nierenbeteiligung. Allerdings haben bisher nur Maintz, J. und Mitarb. (1975) Nierenbeteiligung (bei gleichzeitiger Beteiligung des Zentralnervensystems) nachweisen können, nach Kaboth, U. und Mitarb. (1977). Maintz, J. und Mitarb. (1975) entdecken immunhistologisch (direkte Immunfluoreszenztechnik unter Verwendung von heterologen, monospezifischen Antiseren) Ablagerungen von IgG und Komplement (C 3) in feinstgranulärer Form, stellenweise sogar

mit linearem Charakter, an der epithelialen Seite der Basalmembran im Sinne einer Immunkomplexnephritis. C 1 q können Maintz, J. und Mitarb. (1975) nicht nachweisen; klinisch liegen keinerlei Nierensymptome vor; elektronenmikroskopisch können die Befunde bestätigt werden, Maintz, J. und Mitarb. (1975).
Auf Grund des wahrscheinlichen Zusammenhangs mit der Einnahme von Venopyronum^{R} , Kaboth, U. und Mitarb. (1977); Maintz, J. und Mitarb. (1975); Henningsen, B. und Mitarb. (1976) könnte nach heutiger allgemeiner Ansicht das Pseudo-LE-Syndrom mit dem medikamentösinduzierten LED verwandt sein, Kaboth, U. und Mitarb. (1977). Die tieferen immunpathogenetischen Zusammenhänge dieses Krankheitsbildes sind noch nicht geklärt, Kaboth, U. und Mitarb. (1977).

5.2.11. Penicillamin-Nephropathie

Das nephrotische Syndrom als eine besondere Nebenwirkung nach Penicillamintherapie hat im Rahmen der breiten Anwendung (auch in der Pädiatrie) an Bedeutung gewonnen, Henningsen, B. und Mitarb. (1976).
Immunhistologische Nierenbiopsieuntersuchungen derartiger penicillamininduzierter Nephropathien weisen Immunkomplexablagerungen nach, besonders von IgG und Komplement C 3, Henningsen, B. und Mitarb. (1976). Das Ungewöhnliche dieser Veränderungen besteht darin, daß nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) neben dem Ablagerungsmuster einer Immunkomplexnephritis auch Hinweise auf das gleichzeitige Vorliegen einer Antibasalmembrannephritis gefunden wurden.
Henningsen, B. und Mitarb. (1976) beobachten eine lineare Fluoreszenz neben granulären Ablagerungen. Selbst Monate nach dem Absetzen der Therapie bleiben diese immunhistologischen Veränderungen erhalten, Henningsen, B. und Mitarb. (1976). Über Pathogenese und Antigenqualität dieser Nephropathie bestehen Hypothesen; nach Henningsen, B. und Mitarb. (1976) sind die D- und L-Variante in DL-Penicillamin nephrotoxisch. Bisher scheint ungeklärt, ob eine Goldvorbehandlung, die ihrerseits eine membranöse GN zu induzieren vermag, Henningsen, B. und Mitarb. (1976), das Auftreten eines nephrotischen Syndroms unter Penicillamin begünstigt, Henningsen,B. und Mitarb. (1976).

Immunhistologisch kann die Differentialdiagnose gegenüber eigenständigen Nierenerkrankungen mit nephrotischem Syndrom ohne Schwierigkeiten vorgenommen werden, Henningsen, E. und Mitarb. (1976).

5.2.12. Transplantatnephritis

Eine vermeintliche Nierentransplantat-Abstoßungskrise kann mit Hilfe der Immunfluoreszenz sehr viel sicherer gegenüber einer möglicherweise rekurrierender GN abgegrenzt werden als durch die Histologie alleine, Thoenes, G. H. (1973). Thoenes, G. H. (1973) diskutiert in diesem Zusammenhang folgendes Beispiel:
4 Wochen nach der Transplantation entdeckt die Immunfluoreszenz eine immunologisch ausgeprägte Transplantatnephritis vom perimembranösen Typ. Obwohl eine glomeruläre, vorwiegend subendothelial ablaufende HL-A-Antigen-Immunkomplexreaktion (human leucocyte allo-antigens) nicht beweiskräftig durch die Immunfluoreszenz allein ausgeschlossen werden kann, ist das Bild einer subepithelialen, perimembranösen GN - wie oben dargestellt - ausgesprochen typisch, Thoenes, G. H. (1973). Hier liegt daher die Annahme einer rekurrierenden Nephritis (bei gleichem Nephritistyp in den eigenen und zudem in situ belassenen Nieren) nahe. Thoenes, G. H. (1973) gibt damit ein gutes Beispiel für die Mittlerrolle, die der Immunfluoreszenz zukommt, zwischen pathogenetischem und pathologischem Substrat.

5.2.13. Kritische Schlußbetrachtung über Anwendung der Immunfluoreszenz in der Immunpathologie

In quantitativer Hinsicht muß sich der Immunpathologe immer wieder mit dem Problem auseinandersetzen, welche immunologische Bedeutung dem ausschließlichen Nachweis von Komplement im Glomerulum beizumessen ist, Thoenes, G. H. (1973). Handelt es sich dabei um eine Komplementaktivierung durch den sogenannten „alternativen Weg", der ohne Zwischenschaltung eines Antikörpermoleküls möglich ist, Ludwig, H. und Schernthaner, G. (1978); Seelig, H. P. und Seelig, R. (1977); Thoenes, G. H. (1973); Anders, D. (1977)? - Beim Pseudo-LE-Syndrom wird beispielsweise ein derartiger Aktivierungsweg des Komplementsystems diskutiert,

Kaboth, U. und Mitarb. (1977), - oder werden geringe Mengen Antikörper durch das Komplement maskiert, Thoenes, G. H. (1973)? Ähnliche Fragen wären nach Thoenes, G. H. (1973) für die recht oft zu beobachtende fleckförmige oder komplette Komplement-Positivität von glomerulumnahen Gefäßen zu stellen, die fast immer histologischmit einer Gefäßwandhyalinose korrelieren. Bei den Formen der vorwiegend endokapillär-proliferativen Glomerulonephritiden (die häufigste Manifestation der LE-Nephritis gehört dazu, Henningsen, B. und Mitarb. (1976); Thoenes, G. H. (1973)), - finden sich viele Diskrepanzen zwischen Histologie und Immunhistologie, Thoenes, G. H. (1973).

Geringgradige klinische Symptome und geringe, jedoch unübersehbare morphologische proliferative Veränderungen haben nach Thoenes, G. H. (1973) häufig kein sicheres immunologisches Korrelat. Der Grund dafür ist nicht klar, Thoenes, G. H. (1973), und gerade in dem großen Sammelbecken der proliferativen Nephritiden kann die Immunfluoreszenz nach Thoenes, G. H. (1973) offenbar keine weitere Differenzierung bringen.

Demgegenüber gibt es nach Thoenes, G. H. (1973) keine vom Pathologen klassifizierte perimembranöse GN oder kaum eine mesangioproliferative GN, bei der ein immunologischer Befund fehlt. Wie oben erwähnt, kann ein Goodpasture-Syndrom bereits durch die Immunfluoreszenz in einem Stadium weitgehend diagnostiziert werden, in dem klinisch nur passagere pulmonale Veränderungen zu beobachten sind, Höfer, W. und Misgeld, V. (1977); Thoenes, G. H. (1973).

Die Immunhistologie bringt als besonderen methodischen Vorteil die Schnelligkeit der Ausführung und die qualitative Überlegenheit in der Diagnostik der Nierenkrankheiten mit, Thoenes, G. H. (1973).

Leider haben sich nach Maintz, J. und Mitarb. (1976) die Überlegungen als falsch erwiesen, daß die Aufdeckung eines immunologischen Hintergrundes einer großen Anzahl von Nephritiden die Heilungsaussichten durch Einsatz immunsuppressiver Substanzen und/oder Steroide wesentlich bessern müßte. Die Hoffnung auf praktische therapeutische Konsequenzen haben sich - von wenigen Ausnahmen abgesehen: GN bei Systemerkrankung, Früherkennung des Goodpasture-Syndroms - nicht erfüllt, Maintz, J. und Mitarb. (1976).

5.3.

Im folgenden sollen weitere immunologische Erkrankungen besprochen werden, teilweise in zusammenfassender Wiederholung des bisher Beschriebenen.

5.3.1. Chronische Polyarthritis - rheumatoide Arthritis -

Die Laboruntersuchungen bei chronischer Polyarthritis (weiterhin: cP) lassen sich in solche im Serum und solche im Gelenk unterteilen.

1. Im Serum können neben den Untersuchungen im Sinne eines akuten oder chronisch entzündlichen Prozesses (wie BSG, Blutbild usw.) speziellere Untersuchungen durchgeführt werden.
   Immunfluoreszenzmikroskopisch können die Rheumafaktoren (weiterhin: RF) erfaßt werden, wobei die Möglichkeit besteht, isoliert RF der IgG-, IgM- und der IgA-Klasse zu bestimmen, Müller, W. (1975), Kienholz, M. (1975). Für das Still-Syndrom und die juvenile chronische Polyarthritis sensu strictiori gilt, daß der RF nur in kanpp 20 % der Fälle nachgewiesen werden kann, Kölle, G. (1976). Das Fehlen des RF spricht also nicht gegen die Diagnose einer juvenilen chronischen Polyarthritis, Kölle, G. (1976).
   Weiterhin können im Serum ANF nachgewiesen werden, am besten mit der sehr empfindlichen Immunfluoreszenzmethode, Müller, W. (1975), wobei als Antigen Kerne verschiedener Organe sowie auch unterschiedlicher Spezies dienen können, da diese Antikörper weder organ- noch speziesspezifisch sind, Müller, W. (1975). Durch Benutzung von Serumverdünnungen können ihre Titerwerte ermittelt werden, Müller, W. (1975). Über das unterschiedliche Immunfluoreszenz-Bindungsmuster der ANF wurde an früherer Stelle berichtet. Meist handelt es sich bei der cP um homogene Kernfluoreszenz, die durch Antikörper gegen Desoxyribonukleoproteide hervorgerufen wird, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976); Müller, W. (1975). Die Spezifität der Immunfluoreszenzmethode kann durch Verwendung von Antiseren gegen verschiedene Immunglobuline gesteigert werden, da die ANF bei der cP vornehmlich der IgM-Klasse angehören, Müller. W. (1975).

Auch der Nachweis einer Komplementbindung antinukleärer Faktoren führt diagnostisch weiter, da eine solche selten bei der cP festzustellen ist, im Gegensatz zu LE und Sklerodermie, Müller, W. (1975). Mit Hilfe der Immunfluoreszenz ist es - wie bereits oben ausgeführt - möglich, nicht nur die ANF, sondern simultan auch verschiedene Komplementkomponenten nachzuweisen, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Dabei wird die oben dargestellte doppelte Markierung durchgeführt mit Fluoresceinisothiocyanat und Rhodaminisothiocyanat, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976); Wick, G. und Mitarb. (1976).
Auf die bei der cP, besonders dem Felty-Syndrom, vorkommenden granulozytenspezifischen ANF, die sehr häufig komplementbindend sind, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), wurde hingewiesen.
Weitere Autoantikörper beanspruchen in der Rheumatologie diagnostisches Interesse: das sind die mitochondrialen Antikörper und die Kollagenantikörper, Müller, W. (1975). Letzterer Nachweis erfolgt mit dem recht arbeitsaufwendigen „Antiglobulinkonsumptionstest nach Steffen", Müller, W. (1975).
Die antimitochondrialen (zytoplasmatischen-) Antikörper werden mittels der indirekten Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen. Bei der cP wurden diese Antikörper nicht beobachtet, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976).

2. In Zweifelsfällen wird bei der Diagnostik die Untersuchung des Gelenkmaterials weiterführen. Hier bietet sich zunächst die Untersuchung der Synovialflüssigkeit bei Ergußbildung an, Federlin, K. (1976), u. a., auf Rheumafaktoren, evt. immunhistologische Bestimmung der Immunkomplexe.
Die Bestimmung der RF im Gelenkpunktat bringt nach Müller, W. (1975) meist das gleiche Ergebnis wie im Serum, gelegentlich finden sich höhere Titerwerte im Serum, Müller, W. (1975). Nur selten sind die RF allein in der Synovia vorhanden, gelegentlich sind sie hier aber nicht nachweisbar, wenn der Serumbefund positiv ist, Müller, W. (1976). Daher empfiehlt Müller, W. (1976) die Bestimmung dieser Faktoren in der Synovialflüssigkeit nur bei den seronegativen cP-Fällen. Das gleiche gilt nach Müller, W. (1976) für die Bestimmung der ANF.

Der Nachweis von Immunkomplexen im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten wie etwa der Synovia ist methodisch noch schwierig und hat noch keinen Eingang in die Routinediagnostik gefunden, Müller, W. (1875 und 1976). Gut lassen sich dagegen Immunkomplexe immunfluoreszenzoptisch in Zellen und Geweben nachweisen, Müller, W. (1975); Rosenthal, M. und Mitarb. (1976). Nach Müller, W. (1975) kommen bei der cP Immunkomplexe vor allem in der Synovia, den Zellen der Synovia (phagozytiert in Granulozyten) und der Synovialis vor, sowie auch im interstitiellen Raum der Synovialis. Diese Komplexe enthalten neben IgG - darunter IgG-Rheumafaktoren - oft auch IgM-RF und an die Komplexe fixierte Komplementkomponenten, Müller, W. (1975 und 1976).

Komplexe aus IgG-Globulin und IgG-RF werden auch bei der seronegativen und der juvenilen Arthritis in der Synovia und den Gelenkstrukturen gefunden, Müller, W. (1975). Ihre diagnostische Bedeutung ist noch nicht klar; allgemein läßt sich der Nachweis dieser Immunkomplexe nur in Verbindung mit anderen Krankheitsparametern diagnostisch verwerten, da sie auch bei anderen entzündlichen rheumatischen Prozessen vorkommen, Müller, W. (1975 und 1976).

Kölle, G. (1976), der ausführlich über die juvenile rheumatoide Arthritis berichtet, teilt mit, daß eine Immunkomplexnephritis im Sinne einer Lupus-Nephritis bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Eine wichtige immunologische Untersuchungsmethode ist noch die Bestimmung des Komplementspiegels in der Synovia, Müller, W. (1976) Dieser ist in Relation zum Eiweißspiegel gegenüber dem Serum oft mehr oder weniger deutlich erniedrigt, offensichtlich bedingt durch die Bindung der Komplementkomponenten an die Immunkomplexe, Müller, W. (1976). Leider ist nach Müller, W. (1976) die Bestimmung des C4-Spiegels - nicht immunfluoreszenzoptisch, sondern mittels Partigen^{R}-Platten zu bestimmen - ebenfalls für die cP nicht spezifisch.

Auch weitere immunologische Untersuchungen: wie die Bestimmung der zellulären Immunität, die quantitative immunologische Bestimmung verschiedener Serumeiweißkörper (a1-Antitrypsin, Hapto-

globin, Coeruloplasmin, C-reaktives Protein), werden mittels anderer Methoden als der Immunfluoreszenz durchgeführt. In der Diagnostik haben jedoch diese Bestimmungen wegen des großen Arbeitsaufwandes und der divergierenden Ergebnisse der verschiedenen Autoren noch keinen festen Platz gefunden, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976); Müller, W. (1976).
Rosenthal, M. und Mitarb. (1977) gehen der Frage nach,ob die sogenannte Basistherapie bei cP zu einer Beeinflussung der Immunkomplexe im Serum führt und ob durch derartige Untersuchungen Aussagen über die Wirksamkeit der Therapie gemacht werden können.
Der Nachweis der Immunkomplexe erfolgt mit der von Hurd, E. R. und Mitarb. (1971) - zitiert bei Rosenthal, M. und Mitarb. (1977) - entwickelten indirekten Methode als Inklusion innerhalb menschlicher peripherer Blutleukozyten mit Hilfe von FITC-markierten Antiseren. Leukozyten aus heparinisiertem venösem Blut von normalen Spendern werden mit Hilfe eines Methocel^{R} (Dow Chemicals, Zürich) - Ronpacon^{R} (Cilag-Chemie, Schaffhausen) - Gradienten gewonnen, Rosenthal, M. und Mitarb. (1977). Es folgt ein dreimaliges Waschen mit PBS 0,15 mol,danach werden diese Zellen in einer Konzentration von 10 x 10^{6} /ml in der 0,15 mol PBS suspendiert, Rosenthal, M. und Mitarb. (1977). 0,2 ml der Leukozytensuspension werden nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1977) mit 0,2 ml Patientenserum oder normalem Kontrollserum während 90 min bei 37^{o} C inkubiert. Es folgt ein erneutes dreimaliges Waschen mit 0,15 mol PBS und die Anfertigung von Ausstrichen dieser so behandelten Leukozytensuspension, indem sie mit absolutem Methanol bei +4^{o} C fixiert werden. Anschließend Inkubation während 30 min bei 37^{o} C mit einem polyvalenten Anti-Human-Immunglobulinserum oder einem monospezifischen Anti-Human-C3-Serum unter Verwendung von Antiseren der Ziege in einer Verdünnung 1:10. Nach der Inkubation erneutes dreimaliges Waschen während 10 min in 0,15 mol PBS und danach Beurteilung im Zeiss-Fluoreszenzmikroskop im UV-Auflicht. Rosenthal, M. und Mitarb. (1977). gehen bei der Beurteilung nach der sogenannten „Stufenmethode" und zum anderen nach der sogenannten „Prozentualen Methode" vor. Die genannten Autoren beobachten während der Therapie mit den soge-

nannten „Basistherapeutika" in einem deutlich niedrigen Prozentsatz zirkulierende Immunkomplexe als bei der Behandlung mit nicht steroidalen Antiphlogistika.
Nach Untersuchungen der Autoren scheinen gewisse Korrelationen zwischen dem therapeutischen Effekt der Basistherapie und der Beeinflussung der zirkulierenden Immunkomplexe zu bestehen, doch reichen die Befunde von Rosenthal, M. und Mitarb. (1977) noch nicht aus, um statistisch signifikante Aussagen zu machen. Es gilt nach Rosenthal, M. und Mitarb. (1977) außerdem die Frage zu prüfen, ob man auf Grund des Verhaltens der Immunkomplexe während der Therapie nicht schon früher als durch die Änderung des klinischen Bildes Aussagen über die Wirksamkeit der Behandlung auf den Grundprozeß machen kann.

5.3.2. Lupus erythematodes

Die inzwischen keineswegs mehr seltene Erkrankung ist nach neueren Statistiken auch im kindlich-jugendlichen Alter neben der cP wohl die klinisch wichtigste Kollagenose, Federlin, K. (1976). So berichten u. a. Libit, S. A. und Mitarb. (1976) über einige Fälle von extramembranöser GN (extramembranous glomerulonephritis, MGN) im Kindesalter, die immunhistologisch Merkmale des systemischen Lupus erythematodes (weiterhin: SLE) aufweisen. Die Autoren diskutieren die Frage, wie häufig die SLE sich als besonders feine und undiagnostizierbare Erkrankung bei Patienten mit sogenannter idiopathischer MGN präsentiert. Andere Autoren beschreiben Kinder mit membranöser GN und nephrotischem Syndrom, aus dem sich später eine SLE entwickelte, Bihari, M. und Mitarb. (1972). Grossmann, J. und Mitarb. (1975) berichten von einem 1 Jahr alten Kind mit SLE; die Diagnose wird immunhistologisch an Hand von Hautbiopsien gestellt. Teste auf ANF und LE bei den Eltern dieses Kindes ergeben negative Befunde.
Von einem Kind mit neonatalem LE berichten Levy, St.B. und Mitarb. (1976). Dabei wird eine transplazentare Übertragung von abnormen Serumproteinen oder LE-Faktor von der Mutter mit SLE angenommen, siehe Beck, J. S. und Mitarb. (1966); Klippel, J. H.

und Mitarb. (1974). Anderson, J. A. und Mitarb. (1974) beschreiben die bei einem Säugling auftretende Koinzidenz von Übererregbarkeit gegenüber Kuhmilch mit LE- und Tart-Zell-Phänomen und extrahierbarem nukleärem Antigen (extractable nuclear antigen, ENA). Bei der Mutter des Kindes kann kein LE-Zellphänomen nachgewiesen werden, keine Tart-Zellen, keine DNS-Antikörper oder ENA, Anderson, J. A. und Mitarb. (1974). Die Autoren nehmen an, daß in diesem Falle ähnliche pathogenetische Zusammenhänge vorliegen wie beim medikamentösinduzierten LE, Maintz, J. und Mitarb. (1975), daß ein Kuhmilchprotein sich in vivo mit einem Kernprotein verbunden hat und die Bildung von Kernantikörper provoziert. Anderson, J. A. und Mitarb. (1974) glauben mit dieser Hypothese die Anwesenheit von ENA und LE-Zellformation erklären zu können.

Diese Literaturbeispiele sollen die komplexe Bedeutung des LE in der Pädiatrie unterstreichen. Nach Federlin, K. (1976) ist der Beginn eines Lupus erythematodes disseminatus (weiterhin: LED) in etwa 4 bis 5 % aller Fälle in die Altersgruppe von 0 bis 9 Jahren gelegt, und es fallen bereits 20-25 % der Lupusfälle mit ihrem Beginn in die 2. Lebensdekade, d. h. in das jugendliche Alter, Federlin, K. (1976). Durch zunehmende diagnostische Möglichkeiten dürften sich nach Federlin, K. (1976) diese Zahlen noch erweitern.

Über den Nachweis von ANF, der Bedeutung des Titers und des Musters der Kernfluoreszenz wurde ausführlich berichtet. Dabei wurde ein Immunfluoreszenzverfahren an Kernen hämolysierter Hühnererythrozyten modifiziert nach Helmke, K. und Mitarb. (1974) beschrieben, das es erlaubt, außer dem Nachweis von ANF auch Antikörper gegen denaturierte DNS(Anti-dDNS) und vor allem native DNS (Anti-nDNS)zu demonstrieren, Helmke, K. und Mitarb. (1974); Hoppe, I. (1977). Dieser selektive Anti-DNS-Nachweis ist von großer diagnostischer Bedeutung, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976), denn solche Antikörper sind weitgehend spezifisch für LED, Helmke, K. und Mitarb. (1976); Hoppe, I. (1977); Helmke, K. und Mitarb. (1974). Nach Federlin, K. (1976) kann nur der Nachweis von Antikörpern gegen native DNS im Serum als Nachweis für die Existenz eines LED

angenommen werden, denn nach Hoppe, I. (1977) können diese Antikörper (nach Hoppe, I. (1977) mittels der Farr-Technik) beim aktiven LE regelmäßig nachgewiesen werden, auch dann, wenn der ANF negativ ist. Anti-nDNS stellt ferner nach Hoppe, I. (1977) einen guten Indikator der Krankheitsaktivität dar, eine ähnlich gute Aktivitätsanzeige liefert nach Hoppe, I. (1977) und Federlin, K. (1976) nur noch das Komplement, dessen C'3-Stufe in aktiven Krankheitsphasen stets signifikant vermindert wird, Hoppe, I. (1977). Ein Vergleich der Nachweistechnik von Antikörpern gegen native bzw. denaturierte DNS ergab, daß der sogenannte Anti-dDNS-Nachweis hinsichtlich der Spezifität (Differentialdiagnose!) und der Empfindlichkeit (Verlaufskontrolle!) eindeutig überlegen ist, Hoppe, I. (1977); Kerl, H. und Mitarb. (1975); Monegat, J. N. und Mitarb. (1974).

Genth, E. (1978) berichtet über die klinische Bedeutung von Antikörpern gegen doppelstrangige DNS (ds-DNS-Antikörper). Als deren empfindlichste Nachweisverfahren gelten neben dem indirekten Immunfluoreszenztest (unter Verwendung von Crithidia luciliae als Substrat , Genth, E. (1978) oder mittels Vogelerythrozyten, Helmke, K. und Mitarb. (1974) oder des DNS-Spot-Testes) die Ammoniumsulfat-Präzipitationstechnik und die Nitrozellulosefiltrationstechnik, Genth, E. (1978). Der Wert der Bestimmung von ds-DNS-Antikörpern liegt nach Genth, E. (1978) auch hier in erster Linie in der differentialdiagnostischen Klärung systemischer Krankheitsbilder, bei denen ANF im Suchtest nachgewiesen werden konnten. Ein negativer Befund von ANF im indirekten Immunfluoreszenztest schließt einen aktiven SLE praktisch aus, Rosenthal, M. und Mitarb. (1976); Helmke, K, und Mitarb. (1976); Häntzschel, H. und Mitarb. (1976); Kalden, J. R. (1975), während ein positives Ergebnis diagnostisch vieldeutig sein kann. Werden jedoch Antikörper gegen ds-DNS nachgewiesen und können erniedrigte Serumkomplementspiegel festgestellt werden, so ist nach Genth, E. (1978) die Diagnose des SLE praktisch gesichert. Nur in Ausnahmefällen finden sich ds-DNS-Antikörper bei negativem Nachweis von ANF im indirekten Immunfluoreszenztest, Genth, E. (1978).

Auch das LE-Zellphänomen ist Ausdruck des Vorhandenseins von Kernantikörpern, Müller, W. (1975). Durch die Wirkung dieser

Antikörper werden . Kerne lädierter Zellen homogenisiert und nach Abstoßung des Zytoplasmas von vitalen Zellen, insbesondere von Granulozyten und Makrophagen, phagozytiert, Miescher, P. und Vorlaender, K. O. (1961); Vorlaender, K. O. (1976). Durch diese Phagozytose entsteht die typische LE-Zelle mit dem randständigen Kern und dem großen phagozierten Einschluß in Form eines homogenen Kernes, Müller, W. (1975). Abzutrennen ist diese LE-Zelle von den uncharakteristischen Pseudo-LE-Zellen, bei denen das phagozytierte Material keine Homogenität aufweist, Müller, W. (1975). Das LE-Zellphänomen ist in seiner Bedeutung zurückgegangen, nachdem es lange Zeit für einen LED als einzigen zuverlässigen Laborparameter betrachtet wurde, Federlin, K. (1976); Müller, W. (1975); Fülöp, E. und Mitarb. (1974). Der LE-Zelltest fällt, selbst unter optimalen Bedingungen nur in ca. 75 % der Fälle positiv aus, Federlin, K. (1976); Müller, W. (1975), ferner lassen LE-Zellen eine Parallelität mit der Erkrankung vermissen, Federlin, K. (1976). Ausführlich befassen sich u.a. Häntzschel, H. und Mitarb. (1976) mit der differentialdiagnostischen und prognostischen Bedeutung des LE-Zellfaktors.

Auch heute noch steht der Nachweis zirkulierender antinukleärer Autoantikörper mit einer der zahlreichen Techniken ganz im Vordergrund, Hoppe, I. (1977). Dies ergibt sich z. T. aus der Bequemlichkeit, mit der das Untersuchungsgut, Venenblut, gewonnen werden kann, Hoppe, I. (1977).

Der Nachweis von fixierten ANF an Biopsiematerial wurde dagegen - von Tierexperimenten abgesehen - erst neuerdings für die Klärung spezieller Fragestellungen in die Klinik eingeführt, Hoppe, I. (1977). Ausführlich wurde an vorhergehender Stelle über den immunhistologischen Nachweis von Immunkomplexen in Nierenstrukturen berichtet. Diese Immunkomplexe finden sich beim LE an den Basalmembranen sowie im Mesangium der Glomerula, an den kleinen Nieren- und Hautgefäßen, an der Basalmembran der Haut sowie in den Gefäßwänden auch anderer Körperregionen, Hoppe, I. (1977); Scherer, R. (1976); Helmke, K. und Mitarb. (1976); Asamer, H. (1968). Ihre Zusammensetzung aus IgG-Antikörpern, Komplement und nDNS konnte beim LE durch Einsatz von entsprechend ausgerichteten

fluoreszierenden Coombs-Seren erwiesen werden, u. a. Fülöp, E. und Mitarb. (1974); Henningsen, B. und Mitarb. (1976); Helmke, K. und Federlin, K. (1976).
Die spezifischen Laboruntersuchungen bei Verdacht auf LED bzw. zur Verlaufskontrolle sollen in Tabelle 14 zusammengefaßt werden.

1. Antinukleäre Faktoren (Leber-Nierenschnitte, Immunfluoreszenz), (ANF = AK gegen Nukleoproteine, Histone, DNS, RNS)
2. Anti-DNS-Antikörper (z. B. hämolysierte Hühnererythrozyten, Radioimmunassay)
3. LE-Zell-Test
4. Komplementbestimmung i. S. (C_3) (CH_{50})
5. Nierenbiopsie (Histologie, Immunhistologie)

Tab. 14: „Spezifische" Laboruntersuchungen beim Verdacht auf LED bzw. zur Verlaufskontrolle (Aktivitätszeichen), nach Federlin, K. (1976)

Von Interesse ist der Bericht von Sher, J. H. und Pertschuk, L. P. (1974) über Immunfluoreszenzuntersuchungen des Gehirns bei einem 10 Jahre alten Mädchen mit SLE. Bei diesem Mädchen werden immunhistologisch neben einer membranösen GN granuläre IgG-Ablagerungen subepithelial der Basalmembran des Plexus choroideus nachgewiesen. Diese Untersuchungen nach Sher, J. H. und Pertschuk, L. P. (1974), zum ersten Mal von Atkins, C. J. und Mitarb. (1972) durchgeführt, könnten die Pathogenese des klinischen Syndroms „lupus cerebritis" aufklären, Sher, J. H. und Pertschuk, L. P. (1974).
In der Dermatologie hat die Anwendung der immunhistologischen Untersuchung von Hautbiopsien gerade auch im Rahmen der LE-Diagnostik einen integralen Bestandteil, Scherer, R. (1976); Fülöp, E. und Mitarb. (1974); Diem, E. (1973); Cooperative Studie von Arch. Dermatol. (1975). So sind beim SLE wie auch beim chronisch diskoiden LE (CDLE) gleichartige krankheitstypische Immunfluoreszenzbefunde regelmäßig zu erheben, Scherer, R. (1976). Diese bestehen in granulären Immunglobulinablagerungen (IgG, IgM, selten IgA) unterhalb der dermoepidermalen Verbundzone, Fülöp, E. und

Mitarb. (1974); Cooperative Studie in Arch. Dermatol. (1975); Diem, E. (1973); Scherer, R. (1976). In gleicher Lokalisation läßt sich die Bindung von Komplementkomponenten (C 1q, C 3) nachweisen, Scherer, R. (1976); Diem, E. (1973); Cooperative Studie in Arch. Dermatol. (1975). Einen besonderen prognostischen Wert besitzt nach Scherer, R. (1976) die Untersuchung von klinisch nicht befallener Haut, wobei bei der Biopsieentnahme lichtexponierte Stellen der Haut vorzuziehen sind, Scherer, R. (1976). Positive Immunfluoreszenzbefunde in klinisch unauffälliger Haut sind charakteristisch beim SLE und beim LE chronicus disseminatus mit Tendenz zur viszeralen Beteiligung (insbesondere der Niere) und zur Systematisierung, Grossmann, J. und Mitarb. (1975); Häntzschel, H. und Mitarb. (1976); Fülöp, E. und Mitarb. (1974); Scherer, R. (1976), Diem, E. (1973). Die immunhistologische Diagnose durch Hautbiopsie kann in der Pädiatrie bei neonatalen und frühen LE-Formen von Bedeutung sein, Levy, St.B. und Mitarb. (1976).

5.3.3. Hämolytisch-urämisches Syndrom - Neuraminidase - induzierte Hämolyse -

Im Zusammenhang mit den Autoimmunkrankheiten stellt sich das Hämolytisch-urämische Syndrom als Sonderfall des zugrundeliegenden Immungeschehens dar. Diese Erkrankung, von Gasser, C. erstmals 1955 bei Säuglingen und Kleinkindern beschrieben, ist durch folgende Symptome gekennzeichnet:

1. akute hämolytische Anämie,
2. hämorrhagische Diathese,
3. akutes Nierenversagen, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974).

Prädilektionsalter für das hämolytisch-urämische Syndrom sind das Säuglings- und Kleinkindalter; bei Schulkindern und Erwachsenen tritt diese Erkrankung nur selten auf, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974). Typischerweise findet man bei der Autopsie bilaterale Nierenrindennekrosen, die fokal, segmental oder auch total ausgeprägt sein können, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974).

Bei Immunfluoreszenzuntersuchungen können nach Poschmann, A. und Fischer, K. (1974) und Gervais, M. und Mitarb. (1971) keine Ablagerungen von Immunglobulinen (IgG, IgA, IgM) oder Komplement

(C'3), wohl aber von Fibrin in den Arteriolen und Glomerulum-Kapillaren nachgewiesen werden. Obwohl nur in relativ wenigen Fällen Viren oder Bakterien isoliert werden können, nimmt man heute allgemein ein infektiöses Agens als auslösende Ursache für das hämolytisch-urämische Syndrom an, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974). Bisher konnten die unterschiedlichsten Erreger nachgewiesen werden, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); Müller, H.E. (1969 und 1976); Fischer, K. und Mitarb. (1971); Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Fischer, K. und Poschmann, A. (1971); Fischer, K. (1976). Eine einheitliche Ätiologie dieses Syndroms ist demnach unwahrscheinlich; vielmehr scheint das hämolytisch-urämische Syndrom eine besondere Reaktionsform des Organismus auf ganz unterschiedliche Noxen zu sein, die über die gleiche Pathogenese zu demselben Endstadium führen können, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974). Das hämolytisch-urämische Syndrom muß daher in einem größeren immunologischen Zusammenhang gesehen werden.

Fischer, K. und Mitarb. (1971) konnten ausgehend von einer hämolytischen Anämie bei einem 2 3/4 Jahre alten Kind mit einer schweren Pneumokokken-Pneumonie den pathogenetischen Mechanismus dieser Hämolyse als eine fermentinduzierte Autoimmunhämolyse aufklären. Die Patientenerythrozyten wurden von 12 verschiedenen Seren gesunder, blutgruppengleicher Blutspender agglutiniert, d.h. sie waren polyagglutinabel (Thomsen-Friedenreich-Phänomen), Fischer, K. und Mitarb. (1971). Im Jahre 1927 beschrieb Thomsen, O. zum ersten Mal das Phänomen der Panagglutininabilität menschlicher Erythrozyten, das 1929 von Friedenreich, V. auf eine bakterielle Fermentwirkung zurückgeführt werden konnte. Bei diesem sogenannten Hübner-Thomsen-Friedenreich-Phänomen wird N-Acetyl-Neuraminsäure von der Erythrozytenoberfläche abgespalten, Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); Fischer, K. und Mitarb. (1971); Fischer, K. und Poschmann, A. (1971). Dadurch werden sonst verdeckte Kryptantigene, sogenannte Friedenreich-Antigene, z.B. der T-Rezeptor, freigelegt, die jetzt mit einem im Serum aller Vertebraten vorhandenen T-Agglutinin (Panagglutinin Anti-T, ein natürlicher Antikörper vom IgM-Typ) reagieren können, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); Fischer, K. und Poschmann, A. (1971); Fischer, K. und Mitarb. (1971).

Auf diese Weise kann u. a. eine Hämolyse entstehen. Das bakterielle Enzym (T-Ferment, receptor destroying enzyme = RDE, Vibrio cholerae Neuraminidase = VCN) wurde nach weiteren Untersuchungen als Neuraminidase bezeichnet, Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Fischer, K. und Poschmann, A. (1971); Fischer, K. und Mitarb. (1971). Die Neuraminidase wird nicht nur von Bakterien (Pseudomonales; Eubacteriales), sondern auch von Viren (Myxoviren) und Protozoen (Trichomonas foetus) gebildet, Poschmann, A. und Mitarb. (1976), Müller, H.E. (1976), Fischer, K. (1976).
Eine genaue Zusammenstellung der neuraminidasebildenden Mikroorganismen liefert Tabelle 15.

I.	Viren	
	Orthomyxo-:	Influenza, A, B, C,
	Paramyxo-:	Newcastle disease
		Mumps
		Parainfluenza 1, 2, 3,
II.	Bakterien	
	Pseudomonadaceae:	Pseudomonas (fluorescens, stuzeri, aeruginosa)
	Spirillaceae:	Vibrio cholerae
	Brucellaceae:	Pasteurella (multocida, haemolytica, pseudotuberculosis)
	Lactobacillaceae:	Diplococcus pneumoniae
		Streptococci
		Lactobacillus bifidus E
	Corynebacteriaceae:	Corynebacterium diphtheriae
	Bacillaceae:	Clostridium (perfringens, tertium septicum, sordelli)
	Enterobacteriaceae:	Klebsiella aerogenes
III.	Protozoen	
	Trichomonas fetus	

Tab. 15: Neuraminidasebildende Mikroorganismen, nach, Drzeniek, R. (1972).

Über die biochemischen Daten der Neuraminidase berichtet u. a. Schauer, R. (1975). Die Bedeutung der Neuraminidase als pathogener Faktor für klinische Krankheitsbilder scheint noch unübersehbar, denn ihr Substrat, die N-Acetyl-Neuramisäure ist im biologischen Bereich weit verbreitet und erfüllt eine Reihe von Funtkionen: z.B. ist sie zum größten Teil für die negative Ladung der Erythrozytenoberflächen und der Proteinmoleküle verantwortlich, oder sie bildet die Blutgruppeneigenschaften M und N, Fischer, K. und Mitarb. (1971); Müller, H. E. (1976). Besonders bedeutsam dürfte die Entdeckung sein, daß höhere Organismen offensichtlich ganz allgemein die Lebensdauer mancher Zellen und Serumproteine über deren N-Acetyl-Neuraminsäuregehalt steuern, Müller, H. E. (1976). Nach Müller, H. E. (1976) werden zahlreiche Glykoproteine und ebenso Erythrozyten und Thrombozyten sofort aus dem zirkulierenden Blut eliminiert, wenn sie Teile ihres natürlichen N-Acetyl-Neuraminsäurebesatzes auf ihrer Oberfläche verloren haben. Es wurde sogar beobachtet, Müller, H. E. (1976), daß dieser Eliminationsmechanismus sich auf Hepatitis B-Viren, den sogenannten Dane-Partikel, erstreckt. Auch sie werden schneller aus dem Kreislauf entfernt, und gleichzeitig steigt ihre Immunogenität an, Müller, H. E. (1976).
Eine andere bedeutsame Tatsache wurde vor einigen Jahren entdeckt bei der Untersuchung von Rezeptoren des Choleratoxins, jener Substanz,die für das klassische Cholera-Syndrom verantwortlich ist, daß auch hier die Neuraminidase eine Rolle spielt, Müller, H. E. (1976), obschon die Symptomatik derartiger Darminfektionen völlig anders verläuft als die klinischen Bilder, wie sie durch Sepsis-, Wund-, Haut- oder Schleimhaut-Keime hervorgerufen werden können, Müller, H. (1976), (denn die Choleravibrionen sind fast ausschließlich auf den Darm beschränkt). Eine Reihe von Gangliosiden, die die Mukosazelloberfläche des Zottenepithels im Dünndarm bedecken, wird erst durch die enzymatische Wirkung der Neuraminidase der Choleravibrionen zu den spezifischen Rezeptoren für das Enterotoxin vorbereitet, wie es von Vibrionen und einigen anderen enteropathogenen Escherichia coli-Stämmen gebildet wird, Müller, H. E. (1976). Diese hohe Enzymaktivität im Darm während der Cholera kann nach Müller, H. E. (1976) auch zur Diagnostik ausge-

nützt werden, allerdings in begrenztem Umfang, denn beim Säugling versagt sie, Müller, H. E. (1976). Säuglinge besitzten in höherem Umfang als Erwachsene die sogenannte Bifidum-Flora, einer der harmlosesten Bakterienarten, die Neuraminidase bilden, Müller, H. E. (1976). Und hier liegt eine Ausnahme der Hypothese von der Pathogenität bakterieller Neuraminidase, denn man stellte fest, daß die Spezifität der Bifidum-Neuraminidase äußerst eng ist, im Gegensatz zu dem relativ breiten Substratspektrum der pathogenen Bakterien, Müller, H. E. (1976). Sie spaltet nach Müller, H. E. (1976) u. a. allein die in ketosidischer α, 2 $\longrightarrow$ 3 Stellung gebundene N-Acetylneuraminsäure, während andere Bindungen, (z. B. α, 2 $\longrightarrow$ 4-, α, 2 $\longrightarrow$ 6- und α, 2 $\longrightarrow$ 8-Bindung) nicht bzw. ungleich langsamer hydrolysiert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß auch bei den bekannten Virus-Neuraminidasen ähnlich begrenzte Substratspezifitäten vorliegen und folglich ebenso wie die Bifidus-Neuraminidase im Gegensatz zu vielen bakteriellen Enzymen keine pathogene Bedeutung haben können, Müller, H. E. (1976).

Eine Neuraminidase-Wirkung läßt sich am sichersten durch das Anti-T_{Ah} aus der Erdnuß (Arachis hypogaea) nachweisen, das spezifisch mit dem Kryptantigen T_{Ah} reagiert, Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Fischer, K. und Mitarb. (1971).

Ein anderes Kryptantigen (A_{HP}), das nicht identisch ist mit dem T-Rezeptor, wird durch das von Prokop, O. und Mitarb. (1965) beschriebene Anti-A_{HP} aus der Eiweißdrüse der Weinbergschnecke (Helix promatia) angezeigt, Poschmann, A. und Mitarb.(1976); Fischer, K. und Mitarb. (1971); Poschmann, A. und Fischer, K. (1974). Das Anti-A_{HP} reagiert außerdem spezifisch mit dem genetischen Blutgruppenrezeptor A, Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Fischer, K. und Mitarb. (1971).

Poschmann, A. und Mitarb. (1976) entwickeln Methoden zum Nachweis einer Neuraminidasewirkung sowohl am Einzelerythrozyten als auch an Gewebszellen. Die von den Autoren benutzten Testreagenzien sind zum größten Teil noch nicht in der Industrie erhältlich, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Detaillierte Angaben über deren Herstellung und Austestung können aus der von Poschmann, A.

und Mitarb. (1976) zusammengestellten Übersicht entnommen werden.

Näher sei im folgenden auf die indirekte Immunfluoreszenztechnik zur Darstellung erythrozytärer Rezeptoren eingegangen, nach Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Die Technik der indirekten Immunfluoreszenz an Erythrozytenausstrichen erfolgt bei Poschmann, A. und Mitarb. (1976) nach den Angaben von Fischer, K. und Mitarb. (1971): einmal in isotonischer NaCl-Lösung gewaschene Erythrozyten werden in 5%iger Rinderalbumin-NaCl-Lösung 35%ig aufgeschwemmt. Auf Objektträgern, die vorher 24 Std. in Aceton entfettet wurden, werden dünne Blutausstriche hergestellt, so daß die Erythrozyten einzeln zu liegen kommen, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Eine Stunde Trocknen bei Zimmertemperatur (nach Poschmann, A. und Mitarb. (1976) keine Fixationsmittel, die nach der Erfahrung der Autoren meist zu unspezifischer Fluoreszenz führen!). Aufbringen einer selbstklebenden, perforierten Plastikfolie (Fa. J.H. Krüger, Hamburg, bei Poschmann, A. und Mitarb. (1976), die als Aufnahmeort für die Reagenzien dient. Anschließend 30 min Inkubation mit dem Agglutinin (Anti-T_{Ah}; Anti-A_{HP}) in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur. Dreimal 5 min Waschen in NaCl-Phosphatpuffer (pH 7,2). Mit einem Zellstofftupfer wird nach Poschmann, A. und Mitarb. (1976) die Umgebung der markierten Auftragstellen getrocknet. (Poschmann, A. und Mitarb. (1976) betonen, daß die Auftragstellen selbst nicht mehr eintrocknen dürfen!) Erneute Inkubation mit dem fluoreszeinmarkierten Antiglobulinserum für 30 min in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur. Zweimal 5 min Waschen in NaCl-Phosphatpuffer (pH 7,2). Entfernen der Plastikfolie und einmal 2 min Hämolysieren in Aqua dest., um das fluoreszenzmindernde Hämoglobin zu entfernen. Eindecken in Glycerin-Bicarbonatpuffer (pH 9,5) und Ablesen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Ortholux^{R}-Fluoreszenzeinrichtung (Leitz, Wetzlar): Blaulichtfluoreszenz, Quecksilberhochdrucklampe CS 100 W (Philips), Fluoreszenzauflichtilluminator nach Ploem, J. S. (1967), Erregerfilter: BG 12 (1,5 mm) + Interferenzfilter S 470 + Interferenzteilerplättchen 495 nm (Revolverdrehscheibe Nr. 3), Sperrfilter K 530, Objektive: 25/050, 40/065 und Fl Öl 54/095 und Öl 100/1,30 (Leitz), automatische Mikroskopkamera Orthomat^{R} (Leitz) Ilford-Film HP4 (27 Din).

Die Ergebnisse dieser Untersuchung von Poschmann, A. und Mitarb. (1976) seien kurz zusammengefaßt.
Da der Nachweis einer Neuraminidaseschädigung mit menschlichen Seren unsicher und wenig empfindlich ist, Poschmann, A. und Mitarb. (1976), verzichten die Autoren bei den vorliegenden Untersuchungen auf den Einsatz menschlicher Anti-T-Seren. Es werden vielmehr als Testreagenzien zum Nachweis einer Neuraminidaseschädigung die Agglutinine Anti-T_{Ah} aus der Erdnuß und Anti-A_{HP} aus der Weinbergschnecke verwendet; letzteres Agglutinin kann bei Patienten der Blutgruppe A und AB nicht eingesetzt werden, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Bei der Bestimmung der Empfindlichkeit der verwandten Reagenzien wird eine geometrische Verdünnungsreihe eines standardisierten Neuraminidasepräparates mit jeweils gleichen Teilen O-Erythrozytensediment zusammengebracht; anschließend wird nach Poschmann, A. und Mitarb. (1976) unter reproduzierbaren Bedingungen Agglutinationstiter und Absorptionsvermögen der unterschiedlich stark fermentierten Erythrozyten mit Anti-T_{Ah} und Anti-A_{HP} bestimmt. Besonders eindrucksvoll können Poschmann, A. und Mitarb. (1976) diesen Unterschied mittels der Immunfluoreszenztechnik demonstrieren: mit Anti-A_{HP} fluoreszieren nur die stark neuraminidasebehandelten Erythrozyten (positive und negative Population), während das gleiche Erythrozytengemisch mit Anti-T_{Ah} stark gleichmäßig aufleuchtet (uniforme Population), Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Auf Grund dieser unterschiedlichen Empfindlichkeit der Testreagenzien zum Nachweis einer Neuraminidaseschädigung leiten Poschmann, A. und Mitarb. (1976) folgende praktische Regel ab: positiver Nachweis mit Anti-T_{Ah} bei negativer Reaktion mit Anti-A_{HP} bedeutet leichte Neuraminidaseschädigung, während positiver Nachweis mit beiden Reagenzien eine stärkere Neuraminidaseschädigung anzeigt. Poschmann, A. und Mitarb. (1976) sind auf Grund der unterschiedlichen Agglutininkonsumtion entsprechend der vorher einwirkenden Neuraminidasekonzentration in der Lage, einen Anti-T-Absorptionstest zu entwickeln zum quantitativen Nachweis einer Neuraminidaseschädigung. Bereits Fischer, K. und Mitarb. (1971) konnten mit der Immunfluoreszenztechnik erstmals an Hand des Anti-T-Titers im Patientenserum die Anzahl der transformierten Erythrozyten ermitteln.

Durch Perfusionsversuche an Rattennieren können Poschmann, A. und Mitarb. (1976) mit der indirekten Immunfluoreszenzmethode die durch Neuraminidase freigelegten Kryptantigene T_{Ah} und A_{HP} sowohl an den Erythrozyten als auch an den Nierenkapillaren nachweisen. Auch hier werden die T_{Ah}-Rezeptoren durch geringere Neuraminidasekonzentrationen freigesetzt als die A_{HP}-Rezeptoren, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen auf die direkte Neuraminidaseschädigung von Gefäßendothelien und Erythrozytenmembran.

Bei der Immunfluoreszenzdarstellung der neuraminidasegeschädigten Patientenerythrozyten können Poschmann, A. und Mitarb. (1976) morphologisch 2 Formen unterscheiden:

1. Eine uniforme gleichmäßige Fluoreszenz der geschädigten Patientenerythrozyten nach der Einwirkung von Pneumokokken-Neuraminidase. Auch Fischer, K. und Mitarb. (1971) sehen derartige Bilder sowohl bei der Verwendung von Anti-T_{Ah} als auch von Anti-A_{HP}.
2. Im Gegensatz dazu können Poschmann, A. und Mitarb. (1976) bei einem Patienten mit einer Influenza-Virusinfektion eine getüpfelte Immunfluoreszenz mit Anti-A_{HP} nachweisen. Mit Anti-T_{Ah} reagieren diese Patientenerythrozyten wie alle anderen von Poschmann, A. und Mitarb. (1976) untersuchten neuraminidasegeschädigten Erythrozyten uniform, Poschmann, A. und Mitarb. (1976).

Die Schlußfolgerung, daß eine getüpfelte Immunfluoreszenz mit Anti-A_{HP} spezifisch für eine virale Neuraminidasewirkung ist, muß nach Poschmann, A. und Mitarb. (1976) allerdings noch durch weitere Untersuchungen bewiesen werden.

Zur Abklärung der Frage, ob eine stärkere Neuraminidaseschädigung der Erythrozyten auch mit einem beschleunigten Abbau einhergeht, führen Poschmann, A. und Mitarb. (1976) Immunfluoreszenzuntersuchungen durch. Auch bei diesen Untersuchungen erweist sich das Anti-T_{Ah} als das empfindlichste Reagenz. Poschmann, A. und Mitarb. (1976) können mit dem Anti-T_{Ah} eine so leichte Neuraminidaseschädigung nachweisen, die bom Organismus noch zu keinem beschleunigten Abbau führt. Aus diesen Untersuchungen von Poschmann, A. und Mitarb. (1976) kann allgemein geschlossen werden, daß

neben stark geschädigten Erythrozyten, die schnell abgebaut werden, eine zweite Population auftreten kann, die wegen der leichteren Neuraminidaseschädigung eine praktisch normale Überlebenszeit aufweist, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); Fischer, K. und Mitarb. (1971); Poschmann, A. und Mitarb. (1976).

Auf Grund der dargestellten Untersuchungen kommen die genannten Autoren übereinstimmend zu folgender zusammenfassender Hypothese der Pathogenese der neuraminidaseinduzierten Hämolyse: Durch ein ubiquitäres Umweltantigen („T-Antigen", natürlicher Antikörper vom IgM-Typ, Fischer, K. und Mitarb. (1971)) kommt es analog zu den Isoantikörpern zur Ausbildung des T-Agglutinins, das sich im Serum aller Menschen mit Ausnahme von Neugeborenen und Patienten mit Antikörpermangelsyndrom nachweisen läßt, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Durch eine Infektion mit neuraminidasebildenden Erregern wird N-Acetyl-Neuraminsäure von der Erythrozytenoberfläche abgespalten, Müller, H. E. (1976); Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Fischer, K. und Mitarb. (1971). Bei dieser sogenannten T-Transformation der Erythrozyten, Fischer, K. und Mitarb. (1971) werden Kryptantigene (z. B. der T-Rezeptor) freigelegt, sogenannte Friedenreich-Antigene, die für jede Zellart charakteristisch sind, Fischer, K. und Mitarb. (1971), und die jetzt mit dem T-Agglutinin reagieren können, Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Fischer, K. und Mitarb. (1971); Fischer, K. und Poschmann, A. (1971); Fischer, K. (1976).
Wie oben angedeutet handelt es sich hierbei um eine Art Sonderfall der Autoimmunkrankheiten, denn es existiert bereits ein exogen induzierter Antikörper (T-Agglutinin) neben einem vom Körper selbst gebildeten von Neuraminsäure blockierten Rezeptor. Während also bei diesem Mechanismus Antikörper im Serum aller Menschen vorhanden sind, findet man die bei Autoaggressionskrankheiten nachzuweisenden Autoantikörper in der Regel nicht bei gesunden Personen, Fischer, K. und Poschmann, A. (1971).
Wie aus dem unterschiedlichem Ausgang der Erkrankung durch Berichte von Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); Fischer, K. und Mitarb. (1971) hervorgeht, muß eine nachgewiesene Neuraminidaseschädigung nicht auf die Erythrozytenmembran beschränkt bleiben. Alle Übergänge von einer

leichten Anämie bis zum schwersten hämolytisch-urämischen Syndrom (H.U.S.), Poschmann, A. und Fischer, K. (1974) mit tödlichem Ausgang innerhalb von Stunden wurden beobachtet. Diese Unterschiede im Schweregrad der Erkrankung könnten nach Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); Poschmann, A. und Mitarb. (1976) auf einer verschiedenen Aktivität der Neuraminidase beruhen. Poschmann, A. und Fischer, K. (1974) sowie Fischer, K. und Mitarb. (1971) und Poschmann, A. und Mitarb. (1976) haben auf Grund dieser klinischen Beobachtungen und tierexperimenteller Ergebnisse eine Hypothese zur Pathogenese des hämolytisch-urämischen Syndroms aufgestellt, die in Abbildung 8 deutlich wird.

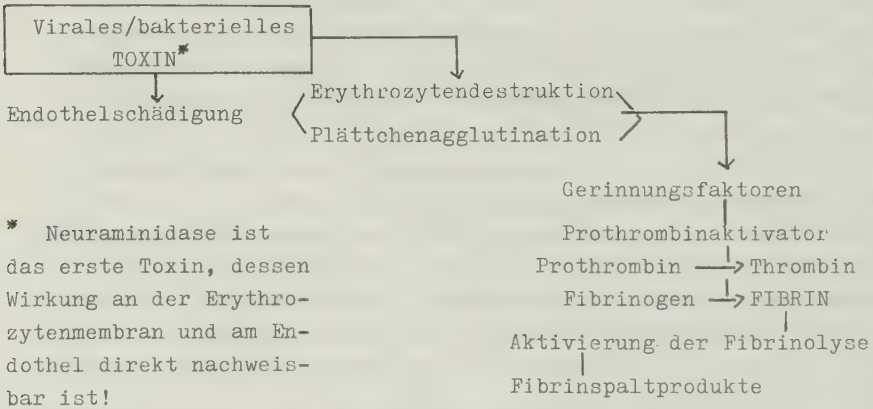


Abb. 8: Hypothese zur Pathogenese des hämolytisch-urämischen Syndroms, modifiziert nach Lanzkowsky, P. u. McCrory, W. (1967)

Ein bakterielles oder virales Toxin (Ferment) kann nach Poschmann, A. und Mitarb. (1976) neben einer Erythrozytendestruktion auch eine direkte Gefäßendothelläsion bewirken (beispielsweise der Nierengefäße, siehe oben). Gerinnungsaktive Stoffe werden freigesetzt, eine disseminierte intravaskuläre Gerinnung kann die Folge sein, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Überschüssige Zwischen- und Endprodukte der Gerinnung werden dabei vom Retikulo-Histiozytären-System (RHS), besonders den Endothelien der Nierengefäße phagozytiert, was zu Zellschädigung, Endothelwucherung und Fibrin-

ablagerung führt, Poschmann A. und Mitarb. (1976). Nach diesen genannten Autoren wäre die schwere Hämolyse zunächst auf direkte Erythrozytenmembranschädigung - einschließlich der Reaktion mit Anti-T - zurückzuführen; eine fermentinduzierte Autoimmunhämolyse, nach Fischer, K. und Mitarb. (1971). Nach Intimaschädigung und Fibrinablagerung kann es zusätzlich zu einer mechanischen Erythrozytenzerstörung kommen, Poschmann, A. und Mitarb. (1976); Poschmann, A. und Fischer, K. (1974).
Demnach wäre das H.U.S. als ein Humanäquivalent des tierexperimentellen Schwartzmann-Sanarelli-Phänomens, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974); und als klinische Äquivalente dieses Phänomens könnten nach Fischer, K. und Mitarb. (1971) auch folgende Syndrome gelten: Waterhouse-Friderichsen-Syndrom, Purpura fulminans und thrombotische Mikroangiopathie.
Von praktischer Bedeutung ist diese Arbeitshypothese der Pathogenese des H.U.S. insofern, als dieses Syndrom ein gutes Ansprechen auf Heparintherapie zeigte, Poschmann, A. und Fischer, K. (1974). Da man eine positive Reaktion mit Anti-T_{Ah} als „Indikator" für eine Neuraminidasewirkung benutzen kann, sollte man nach Meinung von Poschmann, A. und Mitarb. (1976) bei allen Patienten mit Hämolyse und Zeichen eines bakteriellen oder viralen Infektes auf eine Freisetzung von Kryptantigenen testen (trotz der möglicherweise geringen Ausbeute). Bei positiver Reaktion kann dann eine sofortige prophylaktische Heparinisierung eingeleitet werden, Poschmann, A. und Mitarb. (1976). Jene Autoren empfehlen als beste und einfachste Nachweismethode für eine Neuraminidaseschädigung der Erythrozyten die Agglutination mit Anti-T_{Ah}, den Neuraminidase-Test mit Anti-T_{Ah}, die genaue Beschreibung der Methodik dieses Testes bei Poschmann, A. und Fischer, K. (1974).

5.3.4. Chronisch entzündliche Lebererkrankungen

Die chronische Hepatitis stellt kein einheitliches Krankheitsbild dar, vielmehr entspricht sie einem Krankheitsstadium, bei dem akute und chronische Prozesse nebeneinander bestehen, Berg, P. A. (1976). Für die Diagnose sind immunologische Untersuchungen eine wesentliche Ergänzung klinischer, biochemischer und morphologischer Befunde. Zahlreiche Untersuchungen haben das Auftreten von humoralen und zellulären Autoimmunreaktionen gegenüber subzellulären Antigenen wiederholt bestätigt, u. a. Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1972); Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975); Arnold, W. und Mitarb. (1978).

So ist seit ca. 10 Jahren der Nachweis antimitochondrialer Antikörper eine wichtige diagnostische Hilfe zur Begrenzung primärer biliärer Zirrhosen von intra- und extrahepatischen Verschlußsyndromen anderer Genese, Arnold, W. und Mitarb. (1978); Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975).

Zur Differenzierung chronisch entzündlicher Lebererkrankungen sollten nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) folgende immunologische Untersuchungen durchgeführt werden:

1. Nachweis humoraler Autoimmunphänomene: antinukleäre Antikörper (ANA), antimitochondriale Antikörper (AMA), Antikörper gegen glatte Muskulatur (ASMA), Antigammaglobulinfaktoren und Lebermembran-Auto-Antikörper.
2. Nachweis von Hepatitis-B-Virus-Antigenen, und zwar Hepatitis-B-Oberflächen- (surface)-Antigen (HBs-Ag) und Hepatitis-Be-Antigen (HBe-Ag); ferner Nachweis von humoralen Immunreaktionen gegen HBs-Antigen, Hepatitis-B-Kern-(core)-Antigen (HBc-Ag) und HBe-Antigen im Serum (anti-HBs, anti-HBc und anti-HBe) und von HBs-Antigen und HBc-Antigen im Lebergewebe.

Immunelektrophorese und quantitative Immunglobulinbestimmungen können nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) in Einzelfällen zusätzliche Informationen zur Differenzierung chronisch entzündlicher Lebererkrankungen liefern.

Der Nachweis antimitochondrialer Antikörper wird mit Hilfe der fluoreszierenden Antikörpertechnik (FAT) auf humanen Nieren-, Schilddrüsen- und Magengewebe geführt, Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975). Zytoplasmafluoreszenz der distalen

Nierentubuli sind dabei charakteristisch, Meyer zum Büschenfelde, und Arnold, W. (1975). Es ist nach den genannten Autoren notwendig, gleichzeitig Rattennieren zu verwenden, um eine Abgrenzung von antimikrosomalen Antikörpern zu erreichen, die hauptsächlich mit Zytoplasma proximaler Tubuluszellen, aber auch Hepatozyten reagieren, Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975). Die Autoren geben allerdings bei der Verwendung von Rattennieren zu bedenken, daß verschiedene heterophile Antikörper des Menschen mit Tubulusgewebe der Ratte reagieren.
Storch, W. und Emmrich, R. (1973) verwenden zum immunfluoreszenzoptischen Nachweis von Antikörpern gegen Kernmaterial (ANF), gegen glatte Muskulatur (ASMA) und gegen Mitochondrien (AMA) unfixierte Kryostatschnitte von Rattenmägen. Die Autoren gehen folgenermaßen vor: Inkubation mit dem den jeweiligen Antikörper enthaltenden Patientenserum, Spülen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2), Inkubation mit Antihuman-IgG-Serum von Kaninchen, erneutes Spülen, Inkubation mit fluoresceinisothiocyanatmarkiertem Antikaninchenglobulin-Serum, besonders gereinigt. Beim Nachweis von Antikörpern gegen Mitochondrien erhalten Storch, W. und Emmrich, R. (1973) eine feingranuläre Fluoreszenz, vorwiegend des Zytoplasmas der Parietalzellen; Kerne und glatte Muskulatur negativ.
Es soll in diesem Zusammenhang noch einmal auf die indirekten Immunfluoreszenzteste hingewiesen werden unter Verwendung industriell mit Antigen beschichteter Objektträger. Alle für den Reaktionsablauf erforderlichen Reagenzien sind dem sogenannten Kit beigegeben (Beispiel: Immunopath-Test, Fa. Hyland). So sind u. a. der ANA-Test (Nachweis von Antikörpern gegen DNS, RNS, Nucleoproteine und pufferlösliche Proteine), der AMA-Test (Nachweis von Antikörpern gegen Mitochondrien) und der ASMA-Test (Nachweis von Antikörpern gegen glatte Muskulatur) erhältlich.

In neuerer Zeit hat der Nachweis von Hepatitis-Virus-Antigen auf Serum- und Gewebe-Ebene zusätzlich Möglichkeiten eröffnet, das Syndrom der chronisch aktiven Hepatitis (CAH) nach ätiopathogenetischen Gesichtspunkten in Untergruppen zu differenzieren, Arnold, W. und Mitarb. (1978); Baumann, W. und Mitarb. (1976).

Bei Kindern mit chronisch entzündlichen Lebererkrankungen haben Baumann, W. und Mitarb. (1976) zum ersten Mal mittels der direkten Fluoreszenztechnik membranfixiertes IgG nachgewiesen; ferner lieferten diese Autoren den Nachweis von HBsAg und den HBcAg-Nachweis an isolierten Hepatozyten und Leberkryostatschnitten. Lediglich Schweitzer, I. L. und Mitarb. (1973) beobachten elektronenmikroskopisch virusähnliche Partikel in Leberzellkernen von Säuglingen mit protrahiertem Verlauf einer akuten Virus-B-Hepatitis (V-B-H).

Auf Gewebeebene sind bei leberkranken HBs-Antigenträgern mit chronisch aktiver (CAH) bzw. chronisch persistierender (CPH) Hepatitis das HBcAg immunfluoreszenzhistologisch im Leberzellkern und das HBsAg im Zytoplasma nachweisbar, Arnold, W. und Mitarb. (1978), Baumann, W. und Mitarb. (1976). Darüber hinaus ist es durch neuere Untersuchungen gelungen, immunfluoreszenzhistologisch eine enge Assoziation von HBcAg und HBeAg im Hepatozytenkern zu belegen, Arnold, W. und Mitarb. (1978).

Der Nachweis von Antikörpern gegen das HBcAg im Hepatozytenkern ist ein von verschiedenen Autoren beschriebenes Phänomen bei

A) HBsAg-positiven chronischen Hepatitiden, Arnold, W. und Mitarb. (1978); Baumann, W. und Mitarb. (1976).

An isolierten Hepatozyten mittels der direkten Fluoreszenztechnik unter Verwendung von FITC-markiertem Anti-Human-Ig gelingt Baumann, W. und Mitarb. (1976) bei Kindern mit protrahiertem Verlauf einer V-B-H, bei Kindern mit CPH und CAH die Darstellung von membranfixiertem IgG in granulärer Form. In gleicher Weise finden Arnold, W. und Mitarb. (1978) an Membranen isolierter Hepatozyten bei Patienten mit HBsAg-positiven chronischen Hepatitiden in vivo gebundenes IgG in granulärer Form.

Wenige Arbeiten berichten bisher über das Auftreten zirkulierender Immunkomplexe im Serum von HBsAg-Trägern, Hier kündet sich nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) offensichtlich ein Unterschied an zu Hepatitis-B-Virus-induzierten Immunkomplexkrankheiten im Sinne einer Panarteriitis nodosa bzw. membranoproliferativen GN im Kindesalter, bei denen HBs- und HBc-Antigen in Gefäßwänden bzw. an Basalmembranen gefunden wurde, nach Arnold, W. und Mitarb. (1978): Nowoslawski, A.: Workshop report. 10th European Congress

of Allergology and Clinical Immunology, Prag 1977.
Für die Diagnostik der chronischen Virus-B-induzierten Hepatitiden ist ferner die Tatsache von Bedeutung, daß nicht jeder HBs-Antigen-Träger leberkrank ist, Arnold, W. und Mitarb. (1978). Nicht nur morphologisch, klinisch und biochemisch, sondern auch immunologisch und immunhistologisch läßt sich der lebergesunde HBs-Antigen-Träger vom leberkranken abgrenzen, Baumann, W. und Mitarb. (1976); Arnold, W. und Mitarb. (1978). Immunhistologisch wurden allerdings HBs-Ag-seropositive, klinisch und histologisch gesunde Kinder bisher nach Baumann, W. und Mitarb. (1976) noch nicht untersucht.
Tabelle 16 gibt einen Überblick über das Befundmuster auf Serum- und Gewebe-Ebene bei lebergesunden und leberkranken HBsAg- Trägern.

		gesunde HBs-Antigen Träger	HBs-Antigen-positive CAH oder CPH
Serum	HBs-Antigen	+	+
	HBe-Antigen	Ø	+
	DNA-Polymerase	Ø	+
	Dane-Partikel	Ø	(+)
Histologie		normales Lebergewebe	CAH, CHP
Immun-histologie	HBs-Antigen (Zytoplasma)	++	(+)
	HBc-Antigen (Kern)	Ø	++
	HBe-Antigen (Kern)	Ø	++
	Immunglobulin G (Kern/Membran)	Ø	+
humorale Immun-reaktionen	Anti-HBs	Ø	Ø
	Anti-HBc	Ø-++	++
	Anti-HBe	++	Ø
zelluläre Immun-reaktionen	HBs-Antigen	Ø	+/Ø
	HBc-Antigen	(+)	+

Tab. 16: Befundmuster bei „gesunden" und „kranken" HBs-Antigen-Trägern. CAH, CHP = chronisch-aktive bzw. chronisch-persistierende Hepatitis, nach Arnold, W. und Mitarb. (1978)

Die Charakterisierung nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) war vor allem durch zusätzliche Serum-Untersuchungen möglich, wie Nachweis von HBe-Antigen und anti-HBe, der Hepatitis-B-Virus-spezifischen DNA-Polymerase sowie von Dane-Partikeln.
Im Gegensatz zu den HBs-Ag-seropositiven Fällen entdeckten Baumann, W. und Mitarb. (1976) bei ihren Untersuchungen an Kindern einige Kinder, die an einer B) HBsAg-seronegativen CAH erkrankt waren mit IgG als lineare Membranfluoreszenz.

Diese Kinder sind nach Baumann, W. und Mitarb. (1976) im Lebergewebe HBsAg- und HBcAg-negativ.
Auf Grund der Untersuchungen von Baumann, W. und Mitarb. (1976) kann zusammenfassend wiedergegeben werden, daß HBsAg-positive und HBsAg-negative Kinder mit CAH sich durch die fluoreszenzoptische Darstellung dieser Antikörper in granulärer bzw. linearer Anordnung an den Hepatozytenmembranen unterscheiden. Diese Untersuchungsergebnisse lassen den Schluß zu, daß an Hepatozytenmembranen fixiertes IgG für die Pathogenese chronischer Leberentzündungen im Kindes- oder Erwachsenenalter, Arnold, W. und Mitarb. (1978) mit in Betracht gezogen werden kann, Baumann, W. und Mitarb. (1976).
Der Nachweis von HBcAg und HBsAg im Lebergewebe von Kindern kann nach Baumann, W. und Mitarb. (1976) als Hinweis für eine persistierende Virus-B-Infektion und als Indikator für eine gestörte Immunantwort bzw. Immunelimination infizierter Zellen angesehen werden.
Die Persistenz der Infektion, d. h. die Identifizierung HBcAg-produzierender Leberzellen bestimmt nach Baumann, W. und Mitarb. (1976) wahrscheinlich den Übergang in chronische Leberentzündungen, Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975).
Arnold, W. und Mitarb. (1978) diskutieren außer den Hepatitis-B-Virus-induzierten Hepatitiden sogenannte C) autoimmune chronische Hepatitiden.
Neben anderen diagnostischen Parametern (wie extreme Hypergammaglobulinämie mit persistierend hohen IgG-Werten, ferner ANF in 60 % der Fälle, Fehlen von anti-DNA-Antikörpern, antimitochondriale Antikörper in niedrigen Titern) - hat der sogenannte Lebermembran-Autoantikörper Bedeutung erlangt, Arnold, W. und Mitarb. (1978), der gegen ein spezies-unspezifisches Antigen der hepatozellulären Plasmamembran gerichtet ist, Arnold, W. und Mitarb. (1978). Immunhistologisch kann dieser Antikörper an isolierten Hepatozyten als in vivo fixiertes Immunglobulin nachgewiesen werden, Arnold, W. und Mitarb. (1978). Man erkennt dabei ein lineares Membranfluoreszenzmuster, Arnold, W. und Mitarb. (1978); Baumann, W. und Mitarb. (1976). Dieses Phänomen dürfte mit den oben wiedergegebenen Untersuchungsergebnissen von Baumann, W. und Mitarb. (1976) bei HBsAg-negativen Kindern mit CAH identisch sein.

Die Ergebnisse einer kooperativen Studie zeigen nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) eine weitgehende Krankheitsspezifität des Lebermembran-Antikörpers.
Auf die klinische und diagnostische Bedeutung zellulärer Immunreaktionen gegenüber Membranantigenen wird von verschiedenen Autoren hingewiesen, Arnold, W. und Mitarb. (1978); Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1976). Faßt man die Ergebnisse zum Nachweis zellulärer Immunreaktionen, insbesondere gegen ein leberspezifisches Makrolipoprotein aus Plasmamembranen von Hepatozyten, zusammen, so haben nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) etwa 70-80 % der unbehandelten Fälle einer autoimmunen CAH und 30-50 % der HBsAg-positiven chronisch-aktiven Hepatitiden sowie passager akute Virus-B-Hepatitiden diesen pathologischen Befund, Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975). Bei nicht entzündlichen Lebererkrankungen, anderen Autoimmunopathien sowie nach erfolgreicher Behandlung chronisch-aktiver Hepatitis ist dieses Phänomen nicht nachweisbar, Arnold, W. und Mitarb. (1978). Eine ätiopathogenetische Beziehung autoimmuner chronisch-aktiver Hepatitiden zur Hepatitis-B-Virusinfektion - wie von Baumann, W. und Mitarb. (1976) vermutet - konnte nach Arnold, W. und Mitarb. (1978) nicht objektiviert werden, Berg, P. A. (1976); Meyer zum Büschenfelde, K. H. und Arnold, W. (1975). Eher nehmen Arnold, W. und Mitarb. (1978) ein genetisch determiniertes Leiden an, da wie bei anderen Autoimmunopathien das weibliche Geschlecht bevorzugt daran erkrankt, Berg, P. A. (1976).
Die moderne Kombinationstherapie maligner Tumoren und Leukämien im Kindesalter hat neben den Behandlungserfolgen auch Spätfolgen entstehen lassen, Baumann, W. und Mitarb. (1977). So ist bekannt, daß solche Patienten häufiger HBsAg-Träger sind, Baumann, W. und Mitarb. (1977). Diese Autorengruppe unternimmt bei Kindern mit maligner Erkrankung und seropositiven HBsAg histologische und immunhistologische Untersuchungen. Die Autoren halten das gleichzeitige Vorhandensein von HBcAg, HBsAg und e-Antigen auf Gewebe- und Serumebene für den Beweis einer aktiven Virus-B-Replikation in der Leber. Und obschon die Persistenz der Virusinfektion - von wenigen Ausnahmen abgesehen - mit chronischer Leberentzündung einhergeht, Baumann, W. und Mitarb. (1977 und 1976) - beobachten

die Autoren, daß diese Regel nicht für radio-chemotherapeutisch behandelte Tumor- und Leukämiepatienten gilt, Baumann, W. und Mitarb. (1977). Bei den Kindern mit 90 % infizierten Leberzellen finden Baumann, W. und Mitarb. (1977) nur minimale morphologische Veränderungen oder normales Lebergewebe. Diese Befunde stützen nach Baumann, W. und Mitarb. (1977) die Hypothese, daß das Hepatitis-B-Virus allein nicht zytopathogen wirkt, sondern daß dazu Immunreaktionen gegen Hepatitis-B-Komponenten erforderlich sind. Die genannten Autoren folgern, daß solche gegen das Hepatitis-B-Virus, seine Antigene oder damit infizierte Zellen gerichtete Immunreaktionen als pathogenetisches Prinzip chronischer Leberentzündungen, Baumann, W. und Mitarb. (1976) bei einem Teil dieser Patienten gestört sein müssen oder fehlen. Als Ursachen können nach Baumann, W. und Mitarb. (1977) immunologische Besonderheiten der malignen Grunderkrankung und/oder Auswirkungen der Radiochemotherapie auf die Funktion des Immunsystems verantwortlich gemacht werden. Besonders die langzeitüberlebenden Kinder mit Morbus Hodgkin,die darüber hinaus splenektomiert sind, scheinen die Vermutung von Baumann, W. und Mitarb. (1977) nach eigener Aussage zu bestätigen. Es bleibt fraglich, wie lange kindliche Tumor- und Leukämiepatienten mit partieller immunologischer Toleranz gegenüber persistierenden Virus-B-Infektionen lebergesund bleiben, Baumann, W. und Mitarb. (1977). Von praktischer Bedeutung ist, daß diese Kinder potentielle Infektionsquellen darstellen, Baumann, W. und Mitarb. (1977).

5.3.5. Alpha-1-Antitrypsinmangel

In den Jahren 1963 und 1964 wurde von Laurell, C. B. und Eriksson, S. ein Zusammenhang beobachtet zwischen der Verminderung eines mit den Alpha-1-Globulinen wandernden Proteins, des Alpha-1-Antitrypsins (weiterhin Alpha-1-AT) auf ca. 10 % der Norm und im frühen Erwachsenenalter auftretenden, obstruktiven Lungenemphysemen, Karitzky, D. und Künzer, W. (1977); Christen, H. und Henke, J. (1976); Streuli, R. und Grob, P. J. (1977). Seit 1969 ist bekannt, daß es auch im frühen Säuglingsalter ein klinisches Korrelat des homozygoten Alpha-1-AT-Mangels gibt, Karitzky, D. und Künzer, W. (1977): Es handelt sich um eine Hepathopathie, die bereits im

Neugeborenenalter mit einem Icterus prolongatus beginnt und nach heutigem Wissen regelmäßig mit fließendem Übergang oder nach einem Intervall von Monaten bis Jahren zu einer biliären Leberzirrhose führt, Christen, H. und Henke, J. (1976); Streuli, R. und Grob, P.J. (1977); Karitzky, D. und Künzer, W. (1977); Osswald, P. und Mitarb. (1978). Der Alpha-1-AT-Mangel ist eine kodominant vererbbare Defektdysproteinämie, Karitzky, D. und Künzer, W. (1977). Man kennt mindestens 19 kodominante Allele, Karitzky, D. und Künzer, W.(1977), - nach Streuli, R. und Grob, P. J. (1977) sind heute 17 Allele bekannt -, die das sogenannte Pi- (Proteasen-Inhibitor) System bilden, Karitzky, D. und Künzer, W. (1977).
Der biochemische „Defekt" ist beim Z-kodierten Alpha-1-AT genauer bekannt: Nach Streuli, R. und Grob, P. J. (1977) fehlt der Neuraminsäureanteil, wodurch der Transport des in der Leberzelle synthetisierten Alpha-1-AT nach außen erschwert zu sein scheint. Die Folgen davon sind nach Streuli, R. und Grob, P. J. (1977) Anhäufung der Substanz in der Leberzelle, was als diagnostisches Kriterium verwendet werden kann, Streuli, R. und Grob, P. J. (1977), und eine tiefe Serumkonzentration, die aber auch beim homozygoten ZZ-Individuum immer noch 20 % der Norm beträgt, Streuli, R. und Grob, P. J. (1977).
Neben histologischen können auch immunhistologische Untersuchungen diesen pathogenetischen Mechanismus beweisen und diagnostizieren. In ungefärbten, mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Antikörpern gegen Alpha-1-AT behandelten Gefrierschnitten zeigen die „Globuli" (histologisch nachgewiesene rundliche Einschlüsse im Zytoplasma von Hepytozyten mit PAS-positiver Reaktion) eine hellgelbe Sekundärfluoreszenz im UV-Licht, Christen, H. und Henke, J. (1976). Diese immunfluoreszenzoptischen Veränderungen zusammen mit den pathoanatomischen Befunden sind nach Christen, H. und Henke, J. (1976) nur bei Hepatozyten in Kombination mit Alpha-1-AT-Mangel zu finden.
Es gilt jedoch als beinahe gesichert, daß das in den Hepatozyten angereicherte Alpha-1-AT als Ursache für die Leberzirrhose nicht in Betracht kommt, denn nach Streuli, R. und Grob, P. J. (1977) läßt sich die Akkumulation bei allen ZZ-Individuen beobachten, Karitzky, D. und Künzer, W. (1977), also auch bei denjenigen

ohne Zirrhose. Es wird vielmehr vermutet, daß Proteinasen aus den Kupferschen Sternzellen nicht inaktiviert werden und so eine Zerstörung des Lebergewebes zur Folge haben, Streuli, R. und Künzer, W. (1977); Christen, H. und Henke, J. (1976); Osswald, P. und Mitarb. (1978).
Die Indikation für eine Untersuchung auf Alpha-1-AT-Mangel - unterschiedliche quantitative und qualitative Methoden bei Streuli, R. und Grob, P. H. (1977); Laurell, C. B. (1972) - ist in bestimmten Situationen gegeben, Streuli, R. und Grob, H. P. (1977): unklarer Icterus prolongatus; unklare kindliche Leberzirrhose; Frühemphysem; rasch progredientes Lungenemphysem, siehe auch Christen H. und Henke, J. (1976). Wird hier ein ZZ-Individuum gefunden - die Industrie liefert einfache Meß-Kits, damit können homozygote ZZ-Individuen erfaßt werden -, so gilt nach Streuli, R. und Grob, H. P. (1977) die Ätiologie der Erkrankung als erwiesen. Wenn sich jedoch der Patient als heterozygot erweist, so bleibt der Zusammenhang fragwürdig, Streuli, R. und Grob, H. P. (1977); Karitzky, D. und Künzer, W. (1977); Christen, H. und Henke, J. (1976).

5.3.6. Immundiagnostik der Leukämien

Die bisherige Subklassifikation der Leukämien im Kindesalter durch zytochemische Merkmale oder entsprechend der Blastengröße ist zum Teil willkürlich, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978); Mathé, G. und Mitarb. (1971 und 1974); Hayhoe, F.G.J. (1974). Amerikanische Autoren lehnen eine weitere Unterteilung oft ganz ab, Simone, J. V. und Mitarb. (1975), während europäische Untersucher eine Einteilung nach der Blastengröße und nach morphologischem Differenzierungsgrad oder nach zytochemischen Methoden vornehmen, Bennett, J. M. und Mitarb. (1976).
Die zunehmend bessere Kenntnis der physiologischen Differenzierung von hämatopoetischen Zellen erlaubt eine Klassifikation entsprechend dem Differenzierungsgrad, Knapp, W. (1977); Schwenk, H.U. und Schneider, U. (1978). Als Differenzierungsmerkmale werden vornehmlich immunologisch relevante Membranstrukturen - Zellmarker genannt - benützt, Knapp, W. (1977); Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Hierdurch werden Subklassen von lym-

phatischen Zellen entdeckt, die bisher durch morphologische Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnten, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978); Knapp, W. (1977); Marmont, A. M. und Mitarb. (1975); Gavosto, F. A. und Mitarb. (1964).
Interesse gewinnen diese Untersuchungen, wenn man die Leukämie als Differenzierungsstörung auffaßt, die infolge einer reduzierten Absterberate zu einer Anhäufung von neoplastischen Zellen führt, Gavosto, F. A. und Mitarb. (1964); Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Es ist zu erwarten, daß Zellmarkeruntersuchungen das Wissen über Prognose, Verlauf und Pathogenese und evtl. Ätiologie der kindlichen Leukämien erweitern, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978); Mathé, G. und Mitarb. (1974 und 1973).
Eine der ersten immunologischen Untersuchungen der akuten lymphatischen Leukämie (weiterhin ALL) wurde von Marmont, A. M. und Mitarb. (1975) publiziert. Marmont, A. M. und Mitarb. (1975) benutzen Antihuman-Lymphozyten-Globulin (AHLG) vom Tier, um mit Hilfe der direkten und indirekten Immunfluoreszenz reife und unreife Lymphozyten bei Patienten mit ALL nachzuweisen. Die genannten Autoren können fluoreszenzoptisch ein allgemeines Lymphozyten-Antigen nachweisen ohne Zuordnung zu einer bestimmten Subpopulation (B- oder T-Lymphozyten). Auf Grund des heterogenen Ursprungs des AHLG ist nach Marmont, A. M. und Mitarb. (1975) eine Kreuzreaktion nicht absorbierten Antiserums mit reifen und unreifen Myeloid-Zellen nicht verwunderlich. Dies kann aber durch vorherige Absorption des AHLG mit Leukozytenpräparaten von akuten und chronischen myeloischen Leukämie-Fällen abgeschafft werden, Heide, K. und Seiler, F. R. (1972); Marmont, A. M. und Mitarb. (1975). Die beiden am besten untersuchten Subpopulationen sind nach Knapp, W. (1977) die thymusabhängigen Lymphozyten (T-Lymphozyten) und die Bursa-abhängigen Lymphozyten (B-Lymphozyten). Lymphozyten, die weder T- noch B-Zellen-Marker aufweisen, werden derzeit noch als Non-T/Non-B- oder Null-Lymphozyten bezeichnet, Knapp, W. (1977).
Der Nachweis von Immunglobulinen an der Oberfläche von B-Lymphozyten stellt die zuverlässigste Methode zum Nachweis der B-Lymphozyten dar, Knapp, W. (1977). Am einfachsten werden diese

Membranimmunglobuline mit der Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen, Knapp, W. (1977). Dabei werden isolierte Lymphozyten mit einem fluorochromierten Antiserum, das gegen die zu untersuchenden Immunglobuline gerichtet ist, inkubiert und danach gewaschen, Knapp, W. (1977). Die fluorochromierten Antikörper binden sich an den Membran-Immunglobulinen (M-Ig) ab und können fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden, Knapp, W. (1977). Falsch-positive Resultate können jedoch erzielt werden, wenn beschädigte Zellen für die Untersuchung benützt werden oder wenn in der Anti-Immunglobulin-Präparation Aggregate vorhanden sind, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). So werden Leukämiezellen erst nachgewiesen, wenn sie nach Entfernung, z. B. durch Trypsinbehandlung (oder Pronase) erneut synthetisiert werden, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978); Knapp, W. (1977). Sonst kann es sich nämlich nur um den Nachweis des Fc-Rezeptors handeln, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978) (siehe in Tabelle 17). Die ungewünschte Bindung des Anti-Immunglobulins an diesen Fc-Rezeptor kann verhindert werden, wenn zum Nachweis nur F $(ab')_2$-Fragmente benützt werden, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978); Knapp, W. (1977). Nachgewiesene Membran-Immunglobuline sind nach Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978) in ihrer Klasse und Subklasse durch monospezifische Antiseren zu definieren.

Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von Lymphozyten werden nach Knapp, W. (1977) üblicherweise mit der Rosettentechnik bestimmt.

Neben der Nachweisbarkeit von M-Ig und den Komplementrezeptoren wurden nach Knapp, W. (1977) auch die Rosettenbildung mit Maus-Erythrozyten sowie die Nachweisbarkeit von Epstein-Barr-Virus-Rezeptoren als Marker für humane B-Lymphozyten vorgeschlagen. Diese auf B-Lymphozyten, nicht aber auf T-Lymphozyten nachweisbaren Membran-Antigene sind nach Knapp, W. (1977) besonders immungenetisch von Interesse, da die Korrelation derartiger Antigene mit bestimmten Erkrankungen noch ausgeprägter zu sein scheint als die bekannte Assoziation verschiedener Erkrankungen mit HL-A-Antigenen, Knapp, W. (1977).

Die Methode zur Darstellung von T-Lymphozyten ist neben dem weit verbreiteten Rosettentest mit Schaferythrozyten die Verwendung von heterologen T-zellspezifischen Antiseren oder fluorochromierten Konjugaten, Knapp, W. (1977). Die Auftrennung der entsprechenden Lymphozytensubpopulationen und deren Reindarstellung ermöglichen die Untersuchung und das Studium der funktionellen Kapazität der einzelnen Lymphozytensubpopulationen, Knapp, W. (1977). Die Methode zu deren Auftrennung und Gewinnung ist - neben Rosettierung und Gradientenzentrifugation; Zellaffinitätschromatographie; Zellelektrophorese - der „Fluorescence Cell Sorter", Knapp, W. (1977). Dabei werden die Zellen zunächst mit einem fluorochromierten Antiserum inkubiert und gewaschen, Knapp, W. (1977). Mit Hilfe dieser Maschine ist es dann möglich, die Membranfluoreszenz-positiven Zellen von den negativen Zellen zu trennen und einer weiteren funktionellen Austestung zuzuführen, nach Knapp, W. (1977).
Tabelle 17 gibt eine moderne Zusammenstellung der für die Leukämiediagnostik wichtigen Zellmembranmerkmale wieder.
Wenn diese in der Tabelle 17 aufgeführten Marker zur Leukämiediagnostik eingesetzt werden, so ist nach Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978) zu beachten, daß all jene auf Leukämiezellen zu findenden Zellmembranmerkmale keine leukämiespezifischen Strukturen darstellen, sondern Differenzierungsmarker von normalen Zellen sind.

Tabelle 18 faßt die immunologische Klassifikation der kindlichen Leukämien zusammen. So ist beispielsweise die C-ALL (c von englisch: common) – die häufigste kindliche Leukämieform, dadurch gekennzeichnet, daß Membranimmunglobuline und Thymusantigen nicht nachweisbar sind, jedoch auf ellen Leukämiezellen das leukämieassoziierte Antigen (ALL-A) zu finden ist, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Die Blasten sind nicht zur Rosettenbildung mit Schaferythrozyten bei verschiedenen Inkubationstemperaturen befähigt und tragen außerdem das B-Zellalloantigen, ein Merkmal der B-Zelldifferenzierung, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Dieses Oberflächenantigen findet sich außer auf B-Lymphozyten aber auch auf unreifen myeloischen Zellen, Schwenk, H. U. und

Bezeichnung	Abkürzung	Vorkommen (außerhalb Neoplasien)	Methodik
Membranimmunglobuline	SmIg	B-Lymphozyten mit 5.10^5 Molekülen von IgM oder IgD auf einer Zelle; nur eine Ig Klasse einer Spezifität und Allotypie	von einem heterologen (Kaninchen) Antiserum wird F (ab')$_2$ mit erwiesener Monospezifität fluoresceinmarkiert. Die SmIg werden in der direkten Immunfluoreszenztechnik nachgewiesen.
humanes T-Lymphozyten-Antigen	HuTIA	auf peripheren T-Lymphozyten und in höherer Konzentration auf Thymozyten	heterologes Antiserum gegen Thymuszellen, das mit verschiedenen B-Zellinien und Organextrakten absorbiert wurde. Nachweis u.a. im indirekten Immunfluoreszenztest, cytotoxischen Test, Komplementbindungsreaktion
Lymphoblastenleukämie assoziiertes Antigen	ALL-A	fötale Zellen und Knochenmarksstammzellen	heterologes Antiserum gegen intakte Lymphoblasten nach Absorption mit B-Zellinien und Organextrakten, Nachweis u.a. im indirekten Immunfluoreszenztest
Rezeptor für das Fc-Fragment von IgG	FcR	in abnehmender Dichte auf Monozyten, „Null"-Lymphozyten, B-Lymphozyten und aktivierten T-Lymphozyten. Auch in Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems	Rindererythrozyten werden mit IgG beladen oder Immunkomplexe mit Isotopen markiert. Nachweis im indirekten Rosettentest oder radioimmunologisch
Rezeptor für Komplementkomponenten	C3R	ein Teil der B-Lymphozyten, Thymozyten, Hepatozyten und Granulozyten	Schafserythrozyten, beladen mit heterologem IgM und Mäusekomplement (C3d) bzw. mit humanem Komplement. Nachweis im indirekten Rosettentest

Rezeptor für Schafserythrozytenantigen (bei 4° und 37° C Inkubationstemperatur)	SE_4R	T-Lymphozyten und Thymozyten	Glycoprotein, das im direkten Rosettentest nachgewiesen wird
	$SE_{37}R$	nur Thymozyten	
Rezeptor für Mäuseerythrozyten	MER	Subgruppe der B-Lymphozyten	Struktur nicht bekannt. Nachweis im direkten Rosettentest
B-Zellalloantigen (Synonym: Human-I-a-ähnliches Alloantigen)	HI-B	B-Lymphozyten, Vorläufer der Myelopoese, Makrophagen	manche Seren von Multipara enthalten B-Zellalloantikörper. Das Antigen besteht aus zwei assoziierten, jedoch nicht covalent verbundenen Glycoproteinen von 29000 bzw. 34000 daltons. Nachweis im zytotoxischen oder Immunfluoreszenztest (direkt oder indirekt)

Tab. 17: Für die Leukämiediagnostik wichtige immunologische Zellmembranmerkmale, nach Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978)

Leukämietyp	Kennmarker	zusätzliche, fakultative Membranmerkmale	Häufigkeit in %
Mit einem Kennmarker			
C-ALL	ALL-A	FcR C3R HL-B TdT	65
T-ALL	HuTIA	C3R FcR TdT SE_{37} R SE_4 R	20
B-ALL	SmIg	C3R FcR HL-B	2
ohne Kennmarker		FcR C_3R SE TdT HL-B	13
U-ALL			
mehr als ein Kennmarker:			
hybride Leukämieform			
(sehr selten)			

Tab. 18: Einteilung der akuten Lymphoblastenleukämien nach immunologischen Merkmalen. C-ALL: gewöhnliche Lymphyblastenluekämie; T-ALL: Lymphoblastenleukämie mit Thymusmerkmalen; B-ALL: Lymphoblastenleukämie mit Merkmalen der B-Lymphozyten; U-ALL: unklassifizierte Lymphoblastenleukämien. (Weitere Abkürzungen siehe Tabelle 17). Nach Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978)

Schneider, U. (1978); Springer, T. A. und Mitarb. (1977); Immunfluoreszenzuntersuchungen von Marmont, A. M. und Mitarb. (1975). Über nähere Einzelheiten von Enzymen, die mit der immunologischen Subklassifikation der Lymphoblastenleukämie korrelieren, sei auf die Spezialliteratur verwiesen, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978); McCoffrey, R. und Mitarb. (1976);Tamacki, N. und Essner, E. (1969). Eine reichhaltige Literatur über weitere Untersuchungen zur immunologischen Klassifikation der kindlichen Leukämieformen steht zur Verfügung, u.a. Sandilands, G. P. und Mitarb. (1974); Burns, G. F. und Mitarb. (1977); Hsu, C. C. S. und Mitarb. (1975); Metzgar, R. S. und Mitarb. (1974); Altmann, A. J. und Mitarb. (1974); Forman, E. N. und Mitarb. (1977); Rolland, J. M. und Mitarb. (1972); Thomas, D. und Mitarb. (1972). Die Bedeutung der Zellmarker für die Diagnostik von Leukämien und das Ziel derartiger Untersuchungen bestehen darin, die Remissionsqualität eines Knochenmarkausstrichs noch besser beurteilen zu können als bisher, Schwenk. H. U. und Schneider, U. (1978).
Die Therapieauswahl und -intensität sollte sich nach Schwenk, H.U. und Schneider, U. (1978) dann neben der Verträglichkeit an der Qualität der hämatologischen Remission - bestimmt durch die immunologisch erkannte Restpopulation an Blasten im Knochenmark, Graeves, M. F. und Mitarb. (1977) - orientieren. Ferner liegt die Bedeutung der immunologischen Leukämie-Diagnostik darin, daß zu den zahlreichen bekannten Prognosezeichen (besonders bei der akuten Lymphoblastenleukämie (u. a. initiale Leukozytenzahl, Alter, Organinfiltrationen, zytochemische Befunde) als neuer Faktor die immunologische Einteilung der Blasten hinzukommen Sen, L. und Borella, L. (1975); Tsukimoto, I. und Mitarb. (1976); Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Die Charakterisierung von Leukämiezellen durch Zellmarker kann außerdem einen Einblick in die Pathogenese dieser Erkrankung geben.
Aus der Tumorvirologie sind mehrere Beispiele bekannt, wie ein bestimmtes Virus nur eine Lymphozytensubpopulation maligne zu transformieren vermag, Knapp, W. (1977); Noltenius, H. (1977). So wurde durch Zellmarkeruntersuchungen das Burkitt-Lymphom (afrikanischer Typ) als eine B-Zellneoplasie erkannt, die durch das B-lymphozytrope Epstein-Barr-Virus induziert wurde, Binder,

R. A. und Mitarb. (1975); Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Bei der infektiösen Mononukleose erfolgt ebenfalls eine B-Zelltransformation durch das Epstein-Barr-Virus, die aber hier nach Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978) im Gegensatz zum Burkittlymphom polyclonal ist (d.h. permanente Zellinien wachsen in vitro polyclonal aus und produzieren daher verschiedene Immunglobulinklassen), Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Es führt als die polyclonale Infektion zu einer benignen Erkrankung, deren Proliferation zeitlich begrenzt bleibt, während die monoclonale Infektion zur unkontollierten Proliferation führt, Knapp, W. (1977); Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978). Entsprechend wurde durch die Untersuchung der Zellmembranimmunglobuline bei der B-ALL (Lymphoblastenleukämie mit Membranmerkmalen der B-Lymphozyten) und bei der chronischen Lymphadenose (die im Kindesalter jedoch nicht vorkommt) der Nachweis der Monoclonalität der Blasten erbracht, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978).

Andere Autoren berichten über weitere Befunde an der Membranstruktur, die die virale Ätiologie von Leukämien beweisen sollen, Metzgar, R. S. und Mitarb. (1976); Brown, G. und Mitarb. (1975). Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Zellmembranuntersuchungen von Leukämiezellen schon heute verwertbare Ergebnisse liefern: sie zeigen eine große Heterogenität der ALL, die nach Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978) wahrscheinlich eine unterschiedliche Therapieintensität und Therapiedauer erfordert. Weiterhin versucht man die Frühdiagnostik des hämatologischen Rezidivs durch immunologische Zellmembranuntersuchungen zu verbessern, Schwenk, H. U. und Schneider, U. (1978).

Die Anwendung und Bedeutung der Immunfluoreszenztechnik (direkt und indirekt) bei der Untersuchung der für die Leukämiediagnostik wichtigen immunologischen Zellmembranmerkmale wurde angedeutet und in Tabelle 17 zusammengefaßt. Über die immunologischen Membranuntersuchungen von Immunmangelkrankheiten berichtet Knapp, W. (1977). Auch an der Oberfläche vieler maligner Zellen (vielleicht sogar aller derartiger Zellen) anderer maligner Tumoren epithelialen und mesenchymalen Ursprungs konnten Rezeptoren für den Fc-Teil der Immunglobuline G und/oder Rezeptoren für Komple-

ment und/oder Marker für T-Lymphozyten nachgewiesen werden, Nicolson, G. L. (1976); Nicolson, G. L. und Poste, G. (1976); Poste, G. und Weiss, L. (1976); Klein, G. (1975); Cline, M. J. und Mitarb. (1972); Baldwin, R. W. (1973); Noltenius, H. (1977). Neben anderen Untersuchungsmethoden (wie Rosettentest mit Schafserythrozyten) wird von Noltenius, H. (1977) die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, der Autor geht dabei folgendermaßen vor:
100 µl der Tumorgewebe-Zellsuspension (entsprechend 2 x 10^5 Zellen) inkubieren mit fluoresceinkonjugierter IgG-Fraktion gegen menschliches Immunglobulin (Nordic Immunological Laboratories Code RAHu/FITC) 30 min bei 4° C. Anschließend dreimal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung waschen und mit 96 %igem Alkohol fixieren. Fluoreszenzmikroskop und Phasenkontrastmikroskop Zeiss.
In einigen Fällen prüft Noltenius, H. (1977), ob die Tumorzellmembranen auch mit der IgG-Fraktion gegen menschliches Immunglobulin vom Kaninchen reagieren würden. Dies ist nach Noltenius, H. (1977) der Fall, und das fluoreszenzmikroskopische Bild an den Tumorzellen ist identisch mit den fluoreszenzmikroskopischen Bildern an den im gleichen Gewebe vorkommenden B-Lymphozyten. Noltenius, H. (1977) stellt fest, daß die prozentuale Anzahl der Tumorzellen einer Geschwulst, bei denen jene oben genannten Rezeptoren auftreten, in den einzelnen Tumoren verschieden ist. Der Nachweis dieser Rezeptoren könnte nach Noltenius, H. (1977) die histologische Klassifizierung maligner Tumoren durch die sogenannte „Rezeptoren-Subklassifizierung" ergänzen, woraus vielleicht prognostische und therapeutische Konsequenzen erwachsen könnten, Noltenius, H. (1977).

5.3.7. Kollagenkrankheiten

Die Erweiterung der Kenntnisse über die Regulationsmechanismen und den Ablauf der Kollagenbiosynthese hat zur Aufklärung der Ätiologie einiger Bindegewebserkrankungen geführt. Wenn in diesem komplexen Reaktionsablauf der Kollagenbiosynthese Störungen auftreten - etwa infolge eines Enzymdefektes -, dann sind nicht funktionsgerecht aufgebaute bindegewebige Strukturen zu erwarten.

Als Zeichen eines solchen pathologisch veränderten Bindegewebes sind folgende Symptome anzusehen: ein brüchiges und deformiertes Skelett, überstreckbare und luxationsgefährdete Gelenke, eine dünne, zerreißliche Haut, ein zu Erweiterung und Rupturen neigendes Gefäßsysthem und Wundheilungsstörungen, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975).
Einen Überblick über die bisher in ihrer Störung nachgewiesenen Kollagenkrankheiten gibt Tabelle 19.
Über Einzelheiten der biologischen Bedeutung und der Kollagenbiosynthese informieren Monographien und Übersichten verschiedener Autoren, u. a. Penttinen, R. P. und Mitarb. (1975), Teitelbaum, S. L. und Mitarb. (1974); Müller, P. K. und Mitarb. (1975); Literatur ferner bei Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975).
Es ist bekannt, daß die Zellen höherer Organismen mehrere genetisch determinierte Kollagene synthetisieren können - „Kollagenpolymorphismus" nach Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975). Neben dem bekannten Kollagen, das aus zwei Alpha-1-Ketten und einer Alpha-2-Kette im molekularen Verhältnis von 2:1 zusammengesetzt ist und den überwiegenden Teil des Haut-, Sehnen- und Knochenkollagen stellt, dem sogenannten „Kollagen vulgaris" oder Typ-I-Kollagen, existiert das Typ-II- oder Knorpelkollagen im hyalinen Knorpelgewebe, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975). Typ-III-Kollagen findet man in fetalen Geweben, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975); Müller, P. K. und Mitarb. (1977). Nach der Fetalperiode kommt Typ-III-Kollagen in der Haut und in den Gefäßen in einem größeren Anteil, an anderen Stellen des Körpers in geringerem Maße vor, Meigel, W. N. und Müller, P. K. und Mitarb. (1975). Schließlich kann nach Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975) noch ein Typ-IV- oder Basalmembrankollagen unterschieden werden. Im Gegensatz zum „Kollagen vulgaris" enthalten die Kollagentypen II bis IV keine Alpha-2-Kette, sondern sind aus drei jeweils identischen Ketten eines Alpha-1-Typs zusammengesetzt, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975). Weitere Einzelheiten der Kollagenmorphologie bei Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975).

Schritte der Kollagensynthese		Kollagen-Krankheiten
I. Selektion der Strukturgene für die Kollagensynthese; Transkription der genetischen Information für die verschiedenen Alpha-Ketten auf m-RNA		Mögliche Lokalisation der Störung bei autosomal dominanten Formen von: Ehlers-Danlos-Syndrom, Marfan-Syndrom. Osteogenesis imperfecta
II. Translation der m-RNA: Synthese der Prokollagenketten an den Polyribosomen		
III. Posttranslationsschritte der Kollagensythese:		
1. Hydroxylierung	Peptidyl-Prolyl-Hydroxylase	Kein Defekt bekannt
	Peptidyl-Lysyl-Hydroxylase	Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VI
2. Helixausbildung und molekulare Zusammenlagerung	Enzymatische Regulation noch unklar	Kein Defekt bekannt
3. Glykosilierung	Galaktosyl- + Glukosyl-Transferasen	Kein Defekt bekannt
4. Prokollagen-Kollagen-Umwandlung	Prokollagen-Peptidase	Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VII
5. Aldehydbildung	Lysinoxydase	Dermatosparaxie der Kälber und Schafe Osteolathyrismus (Ratte), Kupfermangelkrankheit (Schwein), Lysinoxydasedefizienz (Maus), Menkes-Syndrom
6. Kollagenreifung (Quervernetzung)	ohne Enzym ablaufend	D-Penicillaminwirkung, Homocystinurie

Tab. 19: Lokalisation bisher nachgewiesener Störungen bei erblichen bzw. experimentell erzeugten Kollagenkrankheiten, nach Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975)

Tabelle 20 gibt einen Überblick über Aufbau und Vorkommen der genannten Kollagentypen:

Bezeichnung	Kettentyp	Molekül-zusammen-setzung	Vorkommen
Typ-I-Kollagen	$\alpha_1(I), \alpha_2$	$[\alpha_1(I)]_2\alpha_2$	Haut, Sehnen, Knochen
Typ-II-Kollagen	$\alpha_1(II)$	$[\alpha_1(II)]_3$	Knorpel
Typ-III-Kollagen	$\alpha_1(III)$	$[\alpha_1(III)]_3$	Fetale Gewebe, Gefäße Tumoren
Typ-IV-Kollagen	$\alpha_1(IV)$	$[\alpha_1(IV)]_3$	Basalmembranen

Tab. 20: Genetische Varianten von Kollagen, nach Meigel, W.N. und Müller, P.K. (1975)

Allgemein nimmt man heute an, daß Störungen des „Kollagenpolymorphismus", wie die Synthese eines bestimmten Typs am falschen Ort oder Änderungen des quantitativen Verhältnisses einzelner Typen in einem Gewebe, eine Beeinträchtigung der biologischen Funktion zur Folge haben, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975). Die Richtigkeit dieser Hypothese wird von bestimmten Formen von Osteogenesis imperfecta unterstützt, Müller, P. K. und Mitarb. (1977). Dies ergab sich aus Untersuchungen, u. a. von Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975), an Fibroblasten bei einem Kind mit einer erblichen Bindegewebskrankheit mit Zeichen für Osteogenesis imperfecta. Mit biochemischen und immunfluoreszenzserologischen Methoden weisen die genannten Autoren nach, daß Hautfibroblasten dieses Kindes in der Gewebekultur im Gegensatz zu Kontrollen an Kindern gleichen Alters neben Alpha-1-Typ-I-Ketten (Alpha-1 (I)-Ketten) größere Mengen des Kettentyps Alpha-1 (III) synthetisieren. Auffällig ist in frühen Passagen der Gewebekultur weiterhin eine verminderte Synthese von Alpha-2-Ketten, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975); und es ist nach Müller, P. K. und Mitarb. (1977) anzunehmen, daß diese verminderte Synthese im Zusammenhang mit der langen Persistenz von fetalem Typ-III-Kollagen zu Skelettveränderungen und erhöhter Knochenbrüchigkeit führt.

Müller, P. K. und Mitarb. (1977) weisen bei einem Patienten mit Osteogenesis imperfecta mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode und radiochemisch im Knochengewebe den Kollagentyp III nach. Zur immunfluoreszenzserologischen Untersuchung wird die Knochengewebsprobe gleich nach der Entnahme mit 0,01 M EDETA demineralisiert und anschließend mit dem typenspezifischen Antiserum entweder gegen Kollagen-Typ-I oder -Typ-III beschickt, Nowack, H. und Mitarb. (1976); Müller, P. K. und Mitarb. (1977). Diese so vorbereiteten Proben werden mit einem Zeiss-Standard-19-Mikroskop mit Fluoreszenz-Auflicht-Kondensor untersucht. Vergleichsuntersuchungen werden auf ähnliche Weise mit Knochengewebsproben von gesunden Individuen desselben Alters durchgeführt.
Mit biochemischen Methoden: Chromatographie auf Agarose und CM-Cellulose, radiochemisch mit ^{35}S-Cystein, L (3,4-^{3}H) Prolin und elektronenmikroskopisch weisen Müller, P. K. und Mitarb. (1977) neben dem Kollagentyp III eine dazu relativ gesteigerte Kettentyp-Alpha-1 (III) -Synthese nach und können die Untersuchungsergebnisse von Penttinen, R. P. und Mitarb. (1975) und Müller, P. K. und Mitarb. (1975) an Knochengewebsproben bestätigen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen finden Müller, P. K. und Mitarb. (1977) im erkrankten Knochengewebe ein hohes Verhältnis von Hydroxyprolin zu Prolin. (Nach Epstein, E. H. (1974) und Chung, E. und Miller, E. J. (1974) ist der Hydroxyprolin-Gehalt im Kollagentyp III höher als im Typ(I)-Kollagen).

Immunfluoreszenzserologisch können Müller, P. K. und Mitarb. (1977) in der Kompakta von gesundem Knochengewebe nur Typ(I)-Kollagen identifizieren, während Typ(III)-Kollagen ausschließlich in der Markhöhle nachgewiesen wird, Müller, P. K. und Mitarb. (1977). Im Gegensatz dazu erkennen Müller, P. K. und Mitarb. (1977) fluoreszenzoptisch in der Kompakta des Knochengewebes von Patienten mit Osteogenesis imperfecta tarda zirkuläre Strukturen, „holes", die mit Anti-Typ(III)-Antikörpern, jedoch nicht mit Anti-Typ(I)-Antikörpern in Reaktion treten. Ähnliche Knochenbefunde bei Patienten mit Osteogenesis imperfecta konnten von Teitelbaum, S. L. und Mitarb. (1974) erhoben werden.

Müller, P. K. und Mitarb. (1977) stellen ferner fest, daß das Bindegewebe um jene „holes" zwar mit Typ(I)-, jedoch nicht mit Typ(III)-Kollagenantikörper reagiert. Deutlich können nach den genannten Autoren diese zirkulären Strukturen („holes") im Fluoreszenzbild von der Markhöhle unterschieden werden, die gleichzeitig mit Typ(III)-Kollagenantikörper dargestellt werden können, Müller, P. K. und Mitarb. (1977).
Für die Entstehung jener „holes" geben Müller, P. K. und Mitarb. (1977) zwei alternative Hypothesen:

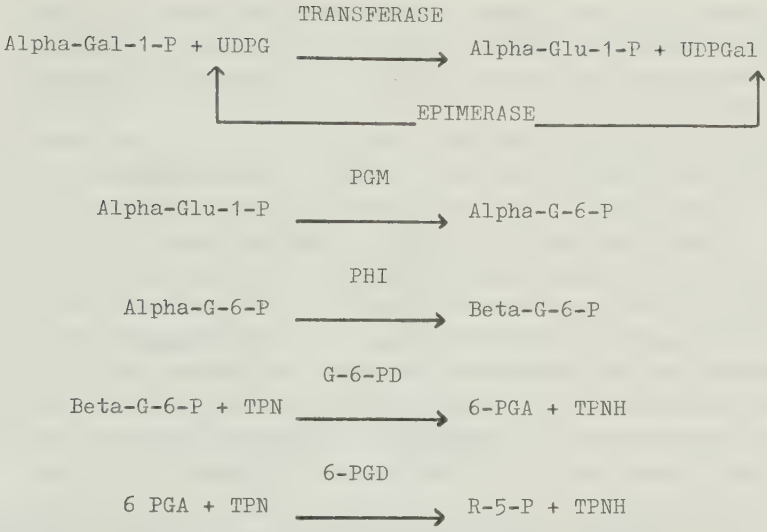
a) Osteoblasten konnten während der Entwicklungsphase exzessiv viel Kollagen Typ (III) gebildet haben, das nicht mehr mineralisierte;
b) oder aber ein Defekt in der Synthese oder der Degradation von Kollagen Typ (I) könnte für die Bildung der zirkulären Strukturen („holes") verantwortlich sein, indem Reparationszellen, die besonders viel Kollagen-Typ (III) synthetisieren, jene „holes" mit diesem Kollagentyp ausfüllen.

Müller, P. K. und Mitarb. (1977) nehmen an, daß diese abnormen zirkulären Strukturen in der Kompakta die hohe Knochenbrüchigkeit und schlechte Frakturheilung erklären. Im Widerspruch dazu stehen andere Untersuchungsbefunde von Müller, P. K. und Mitarb. (1977), ebenfalls an Patienten mit Osteogenesis imperfecta tarda erhoben, die eine normale Synthese des Kollagenkettentyps (III) zeigen.
Die Unordnung der Kollagenbiosynthese scheint nur eine der möglichen Ursachen zu sein, die für diese Kollagenkrankheit verantwortlich ist, Müller, P. K. und Mitarb. (1977).
Bei anderen Patienten mit Osteogenesis imperfecta wird eine verminderte Synthese von Typ-(I)-Kollagen nachgewiesen, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975). Diese Patienten leiden an einer seltenen, rezessiv erblichen Form der Osteogenesis imperfecta, dem sogenannten „broad bone"-Typ, Meigel, W. N. und Müller, P. K. (1975).

Zu den weiteren echten Kollagenkrankheiten zählen das Ehlers-Danlos-Syndrom mit sieben heute bekannten Formen, ferner die Homocystinurie, das Marfan-Syndrom, das Menkes-Syndrom mit Störung der Lysinoxydase und schließlich Kollagenaufbaustörungen durch D-Penicillamin verursacht.

5.3.8. Galaktosämie

Der Galaktosämie liegt eine erbliche Störung im Galaktose-Metabolismus zugrunde, nämlich ein Mangel von Galaktose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase, Beutler, E. und Mitarb. (1966). Dieses Enzym ist normalerweise in den geformten Elementen des peripheren Blutes vorhanden, Isselbacher, K.J. (1960). 1964 berichten Beutler, E. und Mitarb. (1964) von einem Galaktosämienachweis, der auf der Reduktion von Methylenblau in eine farblose Form beruht. Nachteile dieses Testverfahrens sind die Notwendigkeit, unter anaeroben Bedingungen arbeiten zu müssen (mit CO) und die Lichtempfindlichkeit des Testreaktion.
Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) entwickelten später eine Fluoreszenznachweismethode, bei der Triphosphopyridin-Nucleotid (TPN) als endgültiger Elektronenrezeptor benutzt wird. Eine leuchtend helle Fluoreszenz des reduzierten Pyridin-Nucleotid zeigt die Aktivität der Transferase an. Allgemein und zusammenfassend ist dieser Test - auch Beutler-Test genannt - ein Suchtest auf Erythrozytenenzymdefekte. Es kann damit die Aktivität der Enzyme nachgewiesen werden, deren Reaktion mit $TPNH^+$ (oder $DPNH^+$) koppelbar ist, wobei $TPNH^+$ (und $DPNH^+$) fluoreszieren, Bremer, H.J. und Lombeck, I. (1973/74).
Im folgenden sei das Prinzip des Galaktosämie-Fluoreszenztests nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) näher beschrieben; Abbildung 9 zeigt graphisch die metabolischen Abbauwege, die dem Fluoreszenz-Screeming-Test nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) zugrunde liegen:



PGM: Phosphoglucomutase; PHJ: Phosphohexose-Isomerase; G-6-PD: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; 6 PDG: 6-Phosphoglucose-Dehydrogenase.
Abb. 9: nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966).

Vollblut wird mit einem Reaktionsgemisch aus Alpha-Galaktose-1-Phosphat (Gal-1-P-), Uridin-Diphosphoglucose (UDPG), Triphosphopyridin-Nucleotid (TPN), Puffer und einem Hämolyse-Reagenz zusammengebracht. Wenn Transferase vorhanden ist, reagieren UDP und Gal-1-P zu Glucose-1-Phosphat. Diese wird von Phosphoglucomutase - im Hämolysat enthalten - zu Alpha-Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Alpha-Glucose-6-Phosphat erfährt eine spontane und vollständige Mutarotation und wird durch Phosphohexose-Isomerase in Beta-Glucose-6-Phosphat überführt. Und an dieser Stelle unterscheidet sich der Galaktose-Metabolismus von dem in normalen roten Zellen, Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966), wo Fructose-6-Phosphat, - aus Alpha-Glucose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Diphosphat bei Anwesenheit von ATP phosphorylisiert -, auf diese Weise vom Hexose-Monophosphatweg abgelenkt wird.

Im folgenden oxydiert Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, - ebenfalls im Hämolysat enthalten -, Beta-Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconat und wird selbst dabei zu Ribulose-5-Phosphat umgwandelt.
Beide Reaktionsschritte bewirken eine Reduktion von TPN. Dieses reduzierte TPN ($TPNH^+$) gibt nun eine helle Fluoreszenz, wenn es mit langwelligem UV-Licht aktiviert wird. Sogar in Anwesenheit von Hämoglobin kann diese Fluoreszenz hervorgerufen werden, d_a die erregende Energie von kürzerer Wellenlänge ist als die Soret-Bande. Die ausgestrahlte Energie von 465 mμ liegt nahe dem Absorptionsminimum von Hämoglobin. Die Fluoreszenzqualität wird ferner dadurch verbessert, daß das Reaktionsgemisch auf Whatman-Filterpapier N° 1 aufgetragen wird; dies erlaubt eine frühere Trocknung vor der Überprüfung. Das Hämoglobin wird in Form eines Ringes an der Peripherie der Auftragungsstelle konzentriert.
6 Milliliter des Reaktionsgemischs werden nach folgendem Rezept zusammengestellt, nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966): (Siehe Tabelle folgende Seite).
Eine Volumeneinheit des heparinisierten Vollblutes (normalerweise 0,2 ml) wird mit 10 Volumenanteilen des Reaktionsgemischs (gewöhnlich 0,2 ml) zusammengebracht. Die dabei benutzte Pipette wird im Reaktionsglas belassen, und unter aeroben Bedingungen wird die Probe bei 37 ^{o} C inkubiert. Nach zwei Stunden werden einige Mikroliter der Lösung auf Whatman-Filterpapier N° 1 geträufelt zu einem Fleck von der Größe 3 x 15 mm. Dieser Fleck muß trocknen.
Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) prüfen die auf diese Weise vorbereiteten Proben mit einer Handlampe mit langwelligem UV-Licht (z.B. Black-Ray, Ultra Violet Products, Inc., San Gabriel, Calif.). Es zeigt sich eine helle Fluoreszenz der normalen Proben, außerdem der Proben, die von Patienten mit heterozygoter Galaktosämie und der Duarte-Variante stammen.
Nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) können heterozygote Galaktosämieformen und Duarte-Variante der Galaktosämie bereits erkannt werden, wenn die Proben eine Stunde nach der Inkubation aufgetragen werden.

	Conc. of stock sol.	Vol. to make 6,0 ml.
UDPG	$9{,}5 \times 10^{-3}$ M	.2 ml.
Gal-1-P	$2{,}7 \times 10^{-2}$ M	.4 ml.
TPN	$6{,}6 \times 10^{-3}$ M	.6 ml.
Tris-acetate buffer, pH 8,0	.75 M	2.0 ml.
Digiton, or	Saturated sol. 1 %	.8 ml.
Saponin (Mann)		
Di-sodium ehtylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	$2{,}7 \times 10^{-2}$	.03 ml.
H_2O		1.97 ml.

Rezept nach: Beutler, E. und Baluda, M. C. (1966)

Zu diesem Zeitpunkt ist die Fluoreszenz der Proben von heterozygoten Galaktosämieträgern oder homozygoten Trägern der Duarte-Variante beträchtlich herabgesetzt gegenüber den Proben von gesunden Individuen, Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966).
Dieser Fluoreszenz-Screeming-Test ist nach Beutler, E und Baluda, M.C. (1966) auch bei Raumtemperatur durchführbar (22° C); die Reaktionsrate ist dann jedoch um die Hälfte bis auf ein Drittel herabgesetzt. Die Fluoreszenz des beschriebenen Tests ist nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) relativ stabil und nimmt bei Raumtemperatur nur allmählich über einige Tage ab.
Fotografische Aufzeichnungen werden von den genannten Autoren mit geeignetem Gelb-Filtern gemacht.
Eine 50 %ige Suspension von roten Blutzellen in 0,9 % NaCl-Lösung ergibt nach Beutler, E. und Mitarb. (1966) ein ähnliches Testergebnis wie bei der Verwendung von Vollblut.
Die Spezifität der beschriebenen Nachweismethode können Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) dadurch beweisen, daß durch Weglassen von Gal-1-P oder UDP keine Fluoreszenz zu erkennen ist.
In niedriger Konzentration - wie im Reaktionsgemisch vorgeschrieben - fördert EDTA die Entwicklung der Fluoreszenz, Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966), in höherer Konzentration - mehr als 0,1 mg/ml - allerdings hindert EDTA den Ablauf der Testreaktion, Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966).
Als Antikoagulans (1 mg/ml Blut) kann EDTA dem zu untersuchenden Patientenblut beigegeben werden, dann jedoch muß es nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) im Reaktionsgemisch weggelassen werden. Auf der anderen Seite führt Blut, das in Zitrat-Dextose (acid-citrate-dextrose, ACD) gesammelt wurde, zu unbefriedigenden Testergebnissen, Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966).
Die genannten Autoren führen eine kurze Kostenrechnung des Tests auf und weisen darauf hin, daß das Reaktionsgemisch bei -20° C acht Wochen lang aufbewahrt werden kann. Außerdem teilen sie mit, daß das Reaktionsgemisch auch lyophilisiert werden kann, allerdings darf die Temperatur während der Tief-

frierung nicht 20° C übersteigen; ferner muß der Konzentrationsverlust an UDPG, der während der Lyophilisation eintritt, kompensiert werden.
Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) machen ferner die Erfahrung, daß mit heparinisiertem Blut, das für eine Woche bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, dieselben guten Testergebnisse erzielt werden wie mit frisch gewonnenen Blutproben.
Testergebnisse, die mit Nabelschnurblut gewonnen werden, sind nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) bezüglich der Fluoreszenzerscheinung mit den aus venösem Blut von Erwachsenen erhobenen Ergebnissen qualitativ vergleichbar; allerdings dürfen im Reaktionsgemisch weder UDPG noch Gal-1-P fehlen, denn nur unter dieser Bedingung kommt es nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) in Nabelschnurblut zu fluoreszenzoptischen Ergebnissen.
Auf Grund dieser Tatsache, daß der beschriebene Fluoreszenztest nach Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) bereits mit Nabelschnurblut ausgeführt werden kann, so daß die Zeit bis zur endgültigen Diagnose verkürzt wird, ist dieser Test den mikrobiologischen Tests zur Erkennung der diskutierten Stoffwechselanomalie eindeutig überlegen, Bremer, H.J. und Lombeck, J. (1973/74).
Denn auf Grund der Tatsache, daß die Galaktosämie zu den wenigen Enzymdefekterkrankungen zählt, die mit zeitigem Beginn einer entsprechenden Diät erfolgreich behandelt werden kann, Hilgarth, R. und Bremer, H.J. (1975), ist eine Früherkennung von besonderer Bedeutung.
Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966), sowie Bremer, H.J. und Lombeck, I. (1973/74) halten den beschriebenen Fluoreszenztest prinzipiell für eine geeignete Screeming-Methode, den Enzymdefekt, der der Galaktosämie zugrunde liegt, rechtzeitig zu erkennen.
Allerdings weisen Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) darauf hin, daß die Spezifität dieses Tests noch nicht ausreichend ist, da die Differentialdiagnose zum Glucose-6-phosphatdehydrogenase-Mangel nicht erkennbar ist! Ferner geben Beutler, E. und Baluda, M.C. (1966) zu bedenken, daß bisher das Blut

von Neugeborenen, die an Galaktosämie erkrankt sind, noch nicht mit dieser Fluoreszenzmethode untersucht worden ist. Unter Berücksichtigung dieser Kritikpunkte halten Beutler, E. und Baluda, M. C. (1966) den beschriebenen Fluoreszenz-Nachweis für den geeigneten Screening-Test auf Galaktosämie. Für die Untersuchung läßt man Kapillarblut (Blut nach einem Fersenstich) auf Filterpapier einsaugen. Man kann dasselbe Filterpapier benutzen, daß für den Guthrie-Test verwendet wird, Bremer, H. J. und Lombeck, I. (1973/74). Das Kärtchen kann anschließend mit normaler Post in einem Briefumschlag verschickt werden, Bremer, H. J und Lombeck, I. (1973/74). Dieses so gewonnene Untersuchungsgut zeigt nach Beulter, E. und Baluda, M. C. (1966) zwar etwas geringere Fluoreszenz als bei der Verwendung von Vollblut, trotzdem behält der Fluoreszenztest nach Beutler, E. und Baluda, M. C. (1966) auch bei Anwendung dieser praktischen Technik (Verwendung von Kapillarblut) seine - wie oben angedeutet - Bedeutung als Suchtest auf Galaktosämie bei Neugeborenen, Beulter, E. und Baluda, M. C. (1966).

6. Wirtschaftlichkeit der Immunfluoreszenzmethoden

In den vorhergehenden Kapiteln werden ausführlich Theorie, Anwendungsgebiete und diagnostische Wertigkeit des Immunfluoreszenzverfahrens unter Berücksichtigung ihrer Relevanz für die klinische Pädiatrie beschrieben, die Vorteile gegenüber anderen serologischen und gegenüber kulturellen Nachweisverfahren diskutiert und die Problematik maßgeblicher Faktoren der Immunfluoreszenz (Versuchstechnik, Standardisierung) angedeutet. Dabei werden zwangsläufig auch wirtschaftliche Gesichtspunkte dieses Testverfahrens berührt: so bietet beispielsweise die Technik der Immunfluoreszenz im Vergleich zu anderen bekannten serologischen Untersuchungsmethoden den wesentlichen Vorteil der kombinierten Prüfung zweier wichtiger Kriterien des zu untersuchenden Materials:

1. Prüfung der serologisch-immunologischen Spezifität
2. Prüfung der morphologischen Charakteristika, Wick, G. und Mitarb. (1976).

Außerdem steht dem Untersucher das Analysenergebnis in relativ kurzer Zeit zur Verfügung.
Im Vergleich zu kulturellen Verfahren ist neben der wesentlichen Verkürzung der Untersuchungszeit (beispielsweise der Vergleich zu virologischen Standardtechniken zur Diagnostik der bei Kindern häufig vorkommenden pathogenen Viren wie: Parainfluenza-Viren, RS-Viren, MC. Quillin, J. und Mitarb. (1970); ferner in der Bakteriologie die Diagnostik von Bordetella pertussis, Köditz, H. und Wagner, M. (1964)) - die Tatsache u. a. auch von ökonomischer Bedeutung, daß Antibiotikageschädigte Mikroorganismen, die vermehrungsunfähig und also kulturell nicht mehr faßbar sind, in vielen Fällen mit Hilfe der Immunfluoreszenz noch spezifisch zu diagnostizieren sind. - Siehe Beispiele in den Kapiteln über Diagnostik von Bordetella pertussis, enteropathogene Coli-Bakterien und andere mehr. - Die Immunfluoreszenztechnik kann auf diese Weise eventuell noch nachträglich und effizient in den Fällen durchgeführt werden, in denen wegen der Bedrohlichkeit der Krankheitserscheinungen eine Antibiotika-Therapie ohne vorherige bakteriologische Untersuchung eingeleitet wurde, Wick, G. und Mitarb. (1976). Auch in Fällen, in denen wegen der starken Begleitflora eine kulturelle Untersuchung aussichtslos ist, kann nach Wick, G. und Mitarb. (1976) die Immunfluoreszenz noch mit Sicherheit den Erregernachweis liefern. Diese Vorteile der Immunfluoreszenzmethode und ihre spezifische Überlegenheit in ihrer diagnostischen Aussage - siehe u. a. Ausführungen über Diagnostik von Bordetella pertussis -, Cytomegalievirus -, Varizella-Zoster-Virusinfektion, ferner Diagnostik der Autoimmungerkrankungen, - sollen noch einmal die vielfältigen, lohnenden und damit ökonomischen Anwendungsmöglichkeiten dieser Nachweismethode in einer pädiatrischen Poliklinik demonstrieren und ihre Anwendungsfrequenz kalkulierbar machen.
Hinzu kommt, daß die Immunfluoreszenzmethode im Gegensatz zu

elektronenmikroskopischen Untersuchungen schnell, billig und vor allem im Zusammenhang mit den neuen Methoden der Auflichtfluoreszenzmikroskopie technisch einfach durchführbar sind, Wick, G. und Mitarb. (1976); Scherer, R. (1976).
Wiederholt wird auf indirekte Immunfluoreszenztests unter Verwendung industriell mit Antigen beschichteter Objektträger hingewiesen: Nachweis von Antikörpern gegen Treponema pallida (FTA-ABS-Test); Toxoplasma gondii (TIFT); Desoxyribonucleinsäure, Ribonucleinsäure; Nucleoproteine und pufferlösliche Proteine (ANA); Mitochondrien (AMA); Glatte Muskulatur (ASMA).
Neben der optimalen Arbeitsweise und der guten Fluoreszenzqualität der Testergebnisse bieten diese sog. Kits (Sets von Testreagenzien, Reagenzien-Kombinationen) ökonomische Vorteile gegenüber den konventionell durchgeführten Immunfluoreszenztests. Denn obwohl der Fluoreszenz-Treponema-Absorptionstest (FTA-ABS-Test) gegenüber dem Treponema-Immobilisationstest (TPI-Test) beziehungsweise der Toxoplasmose-Immunfluoreszenztest (TIFT) gegenüber dem Sabin-Feldmann-Test (SFT) eine wesentliche Arbeitserleichterung bedeutet, erfordern auch diese Tests noch einen entsprechend großen Zeitaufwand, Roser, H. (1976). Dieser Zeitaufwand ist vor allem durch die Herstellung einwandfreier, mit entsprechenden Antigenen beschichteter Objektträger und der Ermittlung der Gebrauchsverdünnung des fluoreszenzmarkierten Antihuman-Globulinserums bedingt, Poetschke, G. (1976); Braveny, I. und Disko, R. (1976); Roser, H. (1976). Sofern die Objektträger aus dem Routinebetrieb des Laboratoriums verwendet werden, können diese nur durch einen aufwendigen Arbeitsgang einwandfrei fettfrei gemacht werden, Roser, H. (1976).
Die Haftung der Antigene auf den Objektträgern ist aber nur bei absolutem Fehlen jeglicher Fettspuren zu erreichen, Wick, G. und Mitarb. (1976); Roser, H. (1976).
Der Nachweis von Antikörpern gegen DNS, RNS, Nucleoproteine und pufferlösliche Proteine (ANA), Mitochondrien (AMA) und glatte Muskulatur (ASMA) erfordert zusätzlich noch die aufwendige Herstellung von Schnittpräparaten der Leber (Nachweis von ANA),

der Niere (Nachweis von AMA) und der Magenschleimhaut (Nachweis von ASMA) der Ratte, Helmke, K. und Federlin, K. (1976); Berg, P. A. (1976) mit Hilfe eines Mikrotoms, Roser, H. (1976). Die weitere Vorbereitung der Objekiträger ist ebenfalls zeitaufwendig, Wick, G. und Mitarb. (1976); Roser, H. (1976).
Die wirtschaftlichen Vorteile dieser Reagenzien-Kombinationen lassen sich wie folgt zusammenfassen, nach Roser, H. (1976):

1. Der Kit enthält industriell mit dem entsprechenden Antigen beschichtete Objektträger, die tiefgefroren gehalten werden müssen und nach Auftauen sogleich gebrauchsfertig sind.
2. Alle für den Immunfluoreszenztest erforderlichen Reagenzien einschließlich positiver und negativer Kontrollseren sind lyophilisiert oder flüssig gebrauchsfertig vorhanden. Sofern erforderlich, (FTA-ABS-Test und TIFT) sind positive Kontrollen verschiedener Titerhöhen beigefügt.
3. Die Arbeitsweise entspricht der allgemein bekannten Technik für indirekte Immunfluoreszenzteste. Der Reaktionsablauf erfordert etwa 1.1/2 Stunden.
4. Auf jedem Objektträger können je nach Antikörperart 3 (ANA, AMA, ASMA) bis 10 (FTA-ABS-Test, TIFT) Patientenseren aufgetragen, beziehungsweise entsprechende Verdünnungsreihen aufgesetzt werden. Da die Präparatebene der Objektträger jedes Kits praktisch mikroskopisch auf gleicher Ebene liegt, ist ein Nachstellen der Bildebene für jedes folgende Präparat nur mit der Mikrometerschraube erforderlich. Roser, H. (1976) verwendet die Auflicht-Fluoreszenzeinrichtung der Fa. Zeiss mit Auflichtkondensor IV FL, Lampe HBO 50, Blaulichtanregung (FITC), Interferenzfilter BP 455-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520, Objektiv Neofluor 40, Okular 8x. Die Fluoreszenz ist nach Roser, H. (1976) im positiven Fall optimal. Eine volle Verdunklung ist nicht notwendig. Für den FTA-ABS-Test und TIFT ist die Zahl der Treponemen, beziehungsweise der Toxoplasmen pro Blickfeld weitgehend standardisiert, Braveny, I. und Disko, R.

(1976); Poetschke, G. (1976).
An Hand von aktuellen Preislisten werden im folgenden Kostenbeipsiele jener Kits errechnet. Es werden zwei verschiedene serologische Methoden gegenübergestellt:
indirekter Hämoglutinationstest und Immunfluoreszenztest -
zur Diagnose von Toxoplasmose und Syphilis.
Diagnostische Wertigkeit und Anwendungsindikationen wurden oben erörtert.

Reagenzien der Behringwerke
Preisblatt 1978, Institut Behring

Bestell-Nr.:	Reagenzien für den Toxoplasma-IHA-Test	Preis bei Abgabe an Apotheken bzw. Institute ohne U.-St. DM
Ø TST 14	Cellognost(R)-Toxoplasmosis Toxoplasma-IHA-Reagenz lyophilisiert eine Flasche für 5 ml -ausreichend für 100 Einzelbestimmungen-	29.50
Ø TSU 14	Kontroll-Reagenz für Cellognost(R)-Syphilis und Cellognost(R)-Toxoplasmosis lyophilisiert eine Flasche für 5 ml -ausreichend für 100 Einzelbestimmungen-	7.10
Ø TSV 02	Absorptionszellen für Cellognost(R)-Syphilis und Cellognost(R)-Toxoplasmosis lyophilisiert eine Flasche für 5 ml -ausreichend für 10 Absorptionen-	14.70

	Pufferlösung, pH 8,1 für Cellognost(R)-Syphilis und Cellognost(R) Toxoplasmosis	
Ø TSW 40	eine Flasche mit 20 ml	7.20
	Toxoplasma-Kontroll Sera für Cellognost(R)-Toxoplasmosis lyophilisiert	
Ø TSX 10	Combipack eine Flasche für 0,5 ml Toxoplasma-Kontroll-Serum pos. eine Flasche für 0,5 ml Toxoplasma-Kontroll-Serum neg.	26.50

Preis pro Test für Cellognost(R)-Toxoplasmosis

REAGENZIEN	METHODE I	METHODE II	METHODE III	KONTROLLANSÄTZE
Cellognost-Toxoplasmosis 5 ml . 29,50 DM	200 µl / Test : 25 = 1,28 DM	500 µl / Test : 10 = 2,95 DM	550 µl / Test : 9 = 3,28 DM	600 µl / Test : 8,33 = 3,55 DM
Kontroll-Reagenz 5 ml - 7,10 DM	50 µl / Test : 100 = 0,07 DM	50 µl / Test : 100 = 0,07 DM	50 µl / Test : 100 = 0,07 DM	150 µl / Test : 33,23 = 0,20 DM
Pufferlösung pH 8,1 20 ml - 7,20 DM	400 µl / Test : 50 = 0,15 DM	700 µl / Test 1) 850 ul/Test : 28,6 = 0,25 DM 1): 23,5 = 0,30 DM	650 µl / Test : 30,8 = 0,25 DM	1050 µl / Test : 19 = 0,38 DM
Kontroll-Sera 2 x 0,5 ml = 26,50 DM				100 µl / Test : 10 = 2,65 DM
Absorptionszellen 0,5 ml - 14,70 DM		1) 50 µl / Test : 10 = 1,47 DM	50 µl / Test : 10 = 1,47 DM	
Preis pro Test	= 1,50 DM	= 3,30 DM 1) = 4,80 DM	= 5,10 DM	= 6,80 DM

1) Bei Absorption der Sera

Methode I = Suchtest
Methode II = quantitative Antikörper Titerbestimmung
Methode III = Untersuchungsbild

Bei der Berechnung von Serien sind jeweils noch die Kontrollansätze einmal dazuzuzählen.

Reagenzien der Behringwerke

Preisblatt 1978, Institut Behring

Bestell-Nr.	Reagenzien für den Toxoplasma-Immunfluoreszenztest(IFT)	Preis bei Abgabe an Apotheken bzw. Institute ohne U.-St. DM
	Toxoplasma-Suspension für den IFT	
Ø TGY 10	Combipack 1 Flasche für 1 ml Toxoplasma-Suspension lyophilisiert 1 Flasche mit 1 ml Toxoplasma-Suspensionsmedium - ausreichend für 10 Objektträgerbeschickungen	23,50
	Toxoplasma-Anti-Human-Globulin Fluorescein-konjugiert (v.d.Ziege) lyophilisiert	
Ø TKN 04	Flasche für 1 ml	16,50
	Kontroll-Sera für den Toxoplasma-IFT (human) lyophilisiert	
Ø TGV 10	Combipack 1 Flasche für 2 ml Kontroll-Serum, positiv 1 Flasche für 3,2 ml Kontroll-Serum, negativ	39,50
	Obkektträger mit Reaktionsfeldern	
Ø VFA 10	Combipack 10 Objektträger mit 12 Reaktionsfeldern 10 Deckgläser	26, -

Kostenrechnung der Reagenzien für eine Bestimmung, d.h. für einen Patienten.
Für einen Patienten sind 10 Objektträger nötig.

Toxoplasma-Suspension	2,35 DM
Anti-Human-Globulin	2,06 DM
Objektträger	2,60 DM
Kosten pro Patient, - ohne Kontrollen -.	7,01 DM

Kontrollserum	
negativ-,positiv-Combipack	39,50 DM
- für 20 Serien (Kontroll- und Patientenserum)	
Kontrollserum für 1 Kontrollserie	1,98 DM
Kontrollserie pro Ansatz (= pro Objektträger)	8,99 DM
Für einen Patienten kostet die	7,01 DM
Untersuchung, einschließlich der	8,99 DM
Kontrollserie:	16,00 DM

Serie mit 10 Patienten:	79,09 DM
Für 1 Patienten dann	7,91 DM

Serie mit 100 Patienten:	709,99 DM
Für 1 Patienten dann	7,10 DM

Die Kosten für Puffer werden nicht berücksichtigt, da minimal.

Besonders interessant dürfte der indirekte Immunfluoreszenztest auf Toxoplasma-Antikörper für solche Laboratorien sein, die Erfahrung mit der Immunfluoreszenz haben, das gilt beispielsweise für jedes Laboratorium, in dem der FTA-Test praktiziert wird - da die Vorteile, die der indirekte Immunfluoreszenztest gegenüber dem Sabin-Feldmann-Test bietet nur bei exakter Ausführung der Technik zur Geltung kommt, Fuhr, R. (1974).
Es sei erinnert an das oben wiedergegebene Verfahren von Fuhr, R. (1976) zur Langzeitkonservierung und Lagerung von gebrauchsfertigen Antigenen auf Objektträgern. Mit diesem Verfahren sollen der serologischen Diagnostik gebrauchsfertige Antigene zur Verfügung gestellt werden, die beispielsweise für die Immunfluo-

reszenz keiner weiteren Vorbereitung mehr bedürfen, sondern nur noch mit dem zu testenden Serum zu überschichten sind, Fuhr, R. (1976). Von rationeller Bedeutung ist dabei auch die Verlängerung der Lagerfähigkeit auf die Zeit bis zu einem Jahr, Fuhr, R. (1976) und die dadurch erleichterte Bedarfsplanung.
Die Behring-Werke AG, Marburg/Lahn garantieren ihren parasitologischen Reagenzien für den Toxoplasma-Immunfluoreszenztest eine Laufzeit von einem Jahr bei einer Lagerung bei etwa + 4° C bis + 6° C.
Die einmal gelösten Reagenzien der von der Industrie gelieferten Kits sind bei vorschriftsmäßiger Lagerung nur sehr begrenzt haltbar (mehrere Wochen, siehe unten). Einzelheiten sind den Arbeitsanleitungen zur Durchführung des Toxoplasma-Immunfluoreszenztests zu entnehmen, Behring-Werke, AG, Marburg / Lahn; Deutsche bio Mérieux GmbH, Nürtingen; Hyland Travenol GmbH, München, BAG-GmbH, Lich.
Die Durchführung des Toxoplasma-Immunfluoreszenztests mit der Mikrotechnik - wie heutzutage vielfach in der Labordiagnostik eingeführt - stellt einen weiteren wesentlichen Wirtschaftsfaktor dar. Bei geringem Zeit- und Arbeitsaufwand werden kleinere Mengen an Reagenzien benötigt. Nach Mitteilungen aus dem Bundesgesundheitsamt, Bundesgesundheitsblatt Nr. 20, (1976), haben sich Halb- und Mikrotitervollautomaten bewährt.
Unter den Methoden der Syphilis-Grunddiagnostik gilt der Treponema-pallida-Hämoglutinationstest (TPHA-Test) als zuverlässige Suchreaktion (Screeming-Methode), Müller, F. (1977); Remy, B. und Mitarb. (1976); Fegeler, K. und Mitarb. (1975).

Anmerkung:
Der TPHA-Test beruht auf der Bindung unspezifischer Antikörper an Hammelerythrozyten, die nach Formalin- und Tanninvorbehandlung mit einem durch Ultraschall-Fragmentation gewonnenen Treponema pallida-Homogenisat beladen wurden, Roser, H. (1976). Eine positive Reaktion ergibt sich durch eine passive (indirekte) Hämagglutination, Roser, H. (1976). Unspezifische, gegen Hammelblutkörperchen gerichtete Antikörper werden durch

vorherige Absorption eliminiert, Roser, H. (1976); Remy, B. und Mitarb. (1976); Fegeler, K. und Fegeler, F. (1976).
Als Beispiel der Kostenberechnung eine entsprechende Reagenzien-Kombination der Behring-Werke, AG, Marburg /Lahn.

Preis pro Test für Cellognost(R)-Syphilis

REAGENZIEN	METHODE I	METHODE II	METHODE III	KONTROLLANSÄTZE positiv u. negativ
Cellognost-Syphilis 5 ml - 34,80 DM	50 µl / Test : 100 = 0,35DM	100 µl / Test : 50 = 0,70 DM	350 µl / Test : 14,3 = 2,45DM	450 µl / Test 3 3,13 DM : 11,1
Absorptions-medium 20 ml - 18,20 DM	50 µl / Test = 0,05 DM : 400	250 µl / Test = 0,23 DM : 80 1) 1125 µl/Test=1,02 DM 2) 425 µl/Test=0,39 DM	400 µl/Test= 0,35 DM 1) 1275 µl/Test= 1,16 DM 2) 575 µl/Test= 0,53 DM	1150 µl / Test= : 17,4 1,05DM
Kontroll-Reagenz 5 ml - 7,10 DM		50 µl / Test : 100 = 0,07 DM	50 µl / Test : 100 = 0,07 DM	150 µl / Test : 33,33=0,21 DM
Absorptions-zellen 0,5 ml - 14,70 DM		1) 25 µl/Test= 0,74DM : 20 2) 5 µl/Test= 0,15DM :100	1) 25 µl/Test= 0,74DM : 20 2) 5 µl/Test= 0,15DM :100	
Kontroll-Sera je 0,5 ml - 26,50 DM				20 µl/Test = 0,53 DM
Preis pro Test	= 0,40 DM	Absorption 1) = 2,50 DM 2) = 1,30 DM o.Absorption = 1,00 DM	Absorption 1) = 4,80 DM 2) = 3,60 DM o. Absorption = 2,90 DM	= 4,90 DM

1) Absorption im Makroansatz
2) Absorption im Mikroansatz

Methode I = Suchtest
Methode II = quantitative Antikörper-Titer-Bestimmung
Methode III = Untersuchung höherer Konzentrationen

Bei der Berechnung von Serien sind jeweils noch die Kontrollansätze einmal dazuzuzählen.

In der Lues-Routine-Diagnostik hat die Immunfluoreszenz heute einen festen Platz erlangt. Zur Abklärung der Spezifität des TPHA-Tests kann optimal gleichwertig dem Treponema pallida-Immobilisationstest (TPI-Test)der Treponema pallida-Absorptionstest (FTA-ABS-Test) angesehen werden; er gilt damit als Bestätigungsreaktion des TPHA-Tests, Müller, F. (1977); Roser, H. (1976).

Kostenrechnung von FTA- und FTA-ABS-Test:

Reagenzien der Behringwerke

Preisblatt 1978 Behring Institut
(mit eigenen Erläuterungen ergänzt)

Bestell-Nr.	Reagenzien für den Fluoreszenz-Treponema-Antikörper (FTA) -Test und den FTA-Absorptions (FTA-ABS)-Test	Preis bei Abgabe an Apotheken bzw. Institute ohne U.-St. DM
	FTA-Treponema pallidum-Suspension lyophilisiert	
Ø RMK 04	Flasche für 1 ml -ausreichend für etwa 200 Bestimmungen-	48,-
	FTA-Kontroll-Sera (human) lyophilisiert	
Ø RME 10	Combipack 1 ml FTA-Kontroll-Serum (für 5 od. 10 Kontrollen)- positiv 1 ml FTA-Kontroll-Serum (für 10 Kontrollen)- negativ (pro Serie je 1 Kontrolle)	15,50
	FTA-Kontroll-Serum, unspezifisch-positiv (human) lyophilisiert	
Ø RMH 04	Flasche für 1 ml (für 10 Kontrollen)	7,-
	FTA-Absorptions-Medium lyophilisiert	
Ø RMA 14	Flasche für 5 ml -ausreichend für 25 Bestimmungen-	20,-

Blatt 2 des Preisblatts:

	FTA-Anti-Human-Globulin, Fluorescein-konjugiert (v.d. Ziege)	
Ø RMB 10	Combipack (für 40 Bestimmungen) 1 Flasche für 0,5 ml FTA-Anti-Human-Globulin lyophilisiert 1 Flasche mit 10 ml FTA-Tween 80 Pufferlösung	9,65
	FTA-Phosphat-Pufferlösung-Konzentrat	
Ø RMI 44	Flasche mit 100 ml (für ca. 4 Serien) -ergibt 2000 ml gebrauchsfertige Pufferlösung-	6,50
	Objektträger mit Reaktionsfeldern	
Ø VFA 10	Combipack 10 Objektträger mit je 12 Reaktionsfeldern 10 Deckgläser (für 120 Bestimmungen)	26,-
	(Billiger sind selbst hergestellte Objektträger mit Klingerflon-Spray)	

Die Reagenzien für 1 FTA-Bestimmung kosten:

Treponema-Suspension	0,24 DM
Anti-Human- Globulin	0,24 DM
	0,48 DM

Die Reagenzien für 1 FTA-ABS-Test:

Kosten:

Treponema-Suspension	0,24 DM
Anti-Human-Globulin	0,24 DM
Absorptions-Medium	0,80 DM
	1,28 DM

Objektträger mit Reaktionsfeldern 0,22 DM

- selbstgefertigte Objektträger mit Klingerflon^{R}-Spray übersprühen, oder mit Diamantenschreiber Kreise einritzen sind billiger -

Kosten der Reagenzien pro Patient:

	1,28 DM
	0,48 DM
	1,76 DM
ggf. zusätzlich 2 Objektträger mit Reaktionsfeldern	0,44 DM
1. Bisherige Gesamtkosten	2,20 DM

Für jede Serie kommen noch folgende Kosten hinzu:

Puffer	1,60 DM
Kontrollseren	2,25 DM
2.	3,85 DM

Reagenzienkosten für Kontrollen, - 8 Kontrollen, davon 2 mit Absorptions-Medium -

6 x 0,48 DM	2,88 DM
2 x 1,28 DM	2,56 DM
3.	5,44 DM

Eventuelle Kosten für Objektträger mit Reaktionsfeldern:

8 x 0,22 DM	1,76 DM
Dazu Reagenzienkosten für Kontrollen	5,44 DM
4.	7,20 DM

Je größer die Serie, desto wirtschaftlicher, da immer alle Kontrollreihen mitlaufen müssen.

Beispiel:

Serie mit 1 Patienten, Gesamtkosten - einschließlich Objektträger mit Reaktionsfledern - :

1. Reagenzien mit Objektträger mit Reaktionsfeldern:	2,20 DM
2. Puffer mit Kontrollseren:	3,85 DM
3. Reagenzienkosten für Kontrollseren mit Objektträgern mit Reaktionsfeldern:	7,20 DM
Gesamtkosten:	13,25 DM

Serie mit 10 Patienten:

Gesamtkosten:	33,05 DM
Kosten pro Patient:	3,30 DM

Serie mit 100 Patienten:

Gesamtkosten:	231,05 DM
Kosten pro Patient:	2,31 DM

Kosten für Geräteabschreibung und sonstige Hilfsmittel (Personal, Pipetten, Küvetten usw.) sind nicht einkalkuliert.

Anmerkung zur Methodik von FTA-200-Test und FTA-ABS-Test:
FTA-200-Test und FTA-ABS-Test sind die Anwendung der indirekten Immunfluoreszenz in der Lues-Serologie. Die Teste beruhen auf dem Nachweis lues-spezifischer Antikörper durch Bindung an Treponema pallida. Es können auch unspezifische Antikörper vorhanden sein, hervorgerufen durch gemeinsame Antigene von Treponema pallidum mit anderen Spirochäten. Um diesbezügliche Irrtümer zu verhindern, und weil der Titer dieser Antikörper gewöhnlich nicht hoch ist, wurde vorgeschlagen, nur Seren mit einem Titer von mindestens 200 als positiv zu bezeichnen.Die Reaktion - FTA-200-Test genannt - kann jedoch nicht als streng spezifisch gelten, zumal gelegentlich falsch positive Seren auch hohe Titer aufweisen, Palm, G. (1970). Nach heutigen Er-

kenntnissen reicht der FTA-200-Test im Zweifelsfalle als Bestätigungsreaktion (als Suchreaktion gilt der TPHA-Test, siehe oben) im Rahmen der Syphilisgrunddiagnostik nicht mehr aus, Müller, F. (1977). Mit der Durchführung des FTA-ABS-Tests können diese Nachteile eliminiert werden, da im Serum vorher durch einen Extrakt von Reiter-Treponemen die nicht spezifischen Antikörper absorbiert werden, ohne daß der Titer der spezifischen Antikörper dadurch gestört wird, Palm, G. (1970).

Die Haltbarkeit der gelösten Reagenzien hat auch hier im Hinblick auf die praktische Bedarfsplanung Bedeutung. Die Behring-Werke, AG, Marburg / Lahn machen für die einzelnen Reagenzien für den FTA-Test und FTA-ABS-Test folgende Angaben:

1. Treponema pallidum-Suspension:
   Während die aufgelöste Suspension am gleichen Tag verarbeitet werden muß, können die fixierten Präparate bei -20° C mehrere Wochen aufbewahrt werden.
   Die Deutsche bio Mérieux GmbH, Nürtingen, macht zu ihren Reagenzien für den FTA-ABS-Test, speziell zu Treponema pallidum-Suspension, Stamm Nichols, lyophilisiert- folgende Angaben: Nach dem Auflösen ist das Produkt einige Tage bei +4° C haltbar. Es ist empfehlenswert, so viele Objektträger zu präparieren, wie mit dem Inhalt eines Fläschchens (1x1 ml) möglich ist. Die nicht benötigten Objektträger sind in einem gut verschlossenen Behälter unfixiert bei +4° C etwa 3 Wochen, bei -20° C mehrere Monate haltbar.
2. FTA-Kontroll-Sera, positiv, negativ und unspezifisch positiv, nach Behring-Werk, AG, Marburg / Lahn: Bei geringem Bedarf empfiehlt es sich, die gelösten, unverdünnten Sera in geeigneten Teilmengen bei -20° C zu lagern und vor Gebrauch zu verdünnen. Erneutes Einfrieren ist zu vermeiden.
3. FTA-Absorptions-Medium, nach Behring-Werke, AG, Marburg / Lahn: Nicht sofort verbrauchtes Absorptionsmedium bei -20° C lagern.

Nach Deutsche bio Mérieux GmbH, Nürtingen, Absorbens lyophilisiert: Die Lösung hält sich bei +4° C mindestens eine Woche. Das Präparat enthält kein Konservierungsmittel und muß so steril wie möglich gehandhabt werden. Aufgeteilt in kleine Einzelportionen ist die Lösung bei -20° C mehrere Monate haltbar.

4. FTA-Anti-Human-Globulin, fluorescein-konjugiert, nach Behring-Werke, AG, Marburg / Lahn: Das gelöste und verdünnte Anti-Human-Globulin, fluorescein-konjugiert, ist am gleichen Tage zu verbrauchen. Die Stammlösung kann in geeigneten Teilmengen bei -20° C aufbewahrt werden. Erneutes Einfrieren ist zu vermeiden.

In diesem und den anderen Kapiteln werden die vielseitigen Anwendungsgebiete der Immunfluoreszenz dargelegt, ihre diagnostische Wertigkeit gegenüber aneren serologischen Untersuchungsmethoden diskutiert und schließlich die Preiswürdigkeit industriell hergestellter Reagenzien-Kombinationen demonstriert. Anzahl der möglichen Bestimmungen pro Set und Haltbarkeit gelöster und ungebrauchter Reagenzien sollen Anhaltspunkte für eine rationelle Labordiagnostik geben. Es lassen sich hieraus notwendige Kautelen ableiten und konkretisieren, die bei rationeller Anwendung der Immunfluoreszenzmethode zu beachten sind:

Richtige Auswahl der Labormethode, fehlerfreie Gewinnung der Laborbefunde, richtige Bewertung der Ergebnisse, Terminierung der Laborparameter und des Testprogramms.

III. Zusammenfassung

Es wird eine Übersicht gegeben über die praktischen Anwendungsmöglichkeiten der Immunfluoreszenztechnik unter Berücksichtigung ihrer besonderen Bedeutung für die heutige klinische Pädiatrie. Theorie und Methode dieses Testverfahrens werden erörtert, ihre Vorteile gegenüber anderen serologischen und auch kulturellen Nachweismethoden diskutiert, und insbesondere wird auf die Möglichkeiten ihrer Standardisierung hingewiesen.
Es wird in engem Rahmen auch versucht, die neuesten Entwicklungen auf diesem Sektor zu berücksichtigen. Da die Prinzipien der Standardisierung und die technische Durchführung der Tests für alle Modifikationen und Anwendungsgebiete der Immunfluoreszenz annähernd gleich sind, werden sie ausführlich nur anhand ausgewählter Beispiele besprochen, die aus dem mikrobiologischen Bereich und der Immunpathologie stammen.
Zuletzt wird die Wirtschaftlichkeit des Immunfluoreszenzverfahrens untersucht und ihre Preiswürdigkeit anhand von vergleichenden Kostenberechnungen demonstriert, wobei aktuelle Preislisten über industriell hergestellte Reagenzien-Kombinationen („Kits") bekannter Pharma-Firmen zugrunde liegen. Dadurch sollen praktische Aspekte der rationellen Anwendung der Immunfluoreszenz in der klinischen Laboratoriumsdiagnostik gegeben werden.
Im mikrobiologischen Teil der Arbeit wird der Einsatz der Immunfluoeszenzmethode bei der Diagnostik von Bordetella pertussis hervorgehoben und als exakte und spezifische Methode dargestellt, - besonders zur Früherkennung der Pertussis und zur Identifizierung von gesunden Keimträgern.
Bei der Diagnostik enteropathogener Colitypen wird die fluoreszenzoptische Untersuchung als geeigneter Suchtest vorgestellt (insbesondere bei epidemiologischen Ermittlungen), der wegen frühzeitigen, schnellen und qualititativen Ergebnisse der kulturellen Untersuchung überlegen ist.

Ferner wird auf seine Bedeutung zur Verlaufskontrolle unter der Therapie hingewiesen. Damit trägt die Immunfluoreszenz zum erheblichen Fortschritt in der Bekämpfung des Dyspepsie-Coli-Hospitalismus in Kinderkliniken bei.
Die Eignung der indirekten Immunfluoreszenzmethode in der Serodiagnostik der chronischen Pyelonephritis wird erörtert, ihre Überlegenheit gegenüber indirekter Hämagglutination und Widal-Reaktion herausgestellt.
Nicht geeignet ist der indirekte Immunfluoreszenztest zur Infektionslokalisation bei Kindern - besonders bei Mädchen - mit rekurrierenden Harnwegsinfekten (HWI). Es wird über vergleichende Untersuchungen von Fairley-Test- Blasenauswaschtest- und Immunfluoreszenztest zum Nachweis von antikörperbeladenen Bakterien im Urinsediment berichtet.
Geschildert wird im übrigen die Anwendung des Immunfluoreszenzverfahrens zur Diagnostik von Salmonellen spezies, Staphylococcus aureus, Beta-hämolysierenden Streptokokken, Mykoplasma-Pneumoniae-Erreger, Erreger der bakteriellen Meningitis und die Typenzuordnung von Hämophilus influenzae.
Diagnostischer Aussagewert, technische und methodische Vorteile werden hervorgehoben.
Die Bedeutung des Immunfluoreszenztests in der virologischen Laboratoriumsdiagnostik wird insbesondere für die Diagnose von Varizella-Zoster-Virus-(VZV-) und Zytomegalievirusinfektionen dargestellt. Die empfindlichen immunfluoreszenzserologischen Untersuchungen dienen dazu, einerseits die Diagnose einer VZV-Infektion zu sichern, andererseits kann so die humorale Immunreaktion der Mütter und Kinder geprüft werden.
Umfassend wird über die klinische Bedeutung der Zytomegalie als prä- und perinatale Infektion referiert und auf die Risikosituationen hinsichtlich Erwerb dieser Infektion im Kleinst- und Kindesalter hingewiesen.
Die Serumdiagnostik mit dem indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Test wird ausführlich besprochen und ein Verfahren erörtert, das es erlaubt, auf einfache Weise möglichst viele und ein-

heitliche, mit Cytomegalievirus infizierte Deckglaskulturen zu gewinnen und für die Titerbestimmung von Zytomegalieantikörpern zu benutzen. Die Überlegenheit des Immunfluoreszenztests als die empfindlichere Methode gegenüber der Komplementbindungsreaktion (KBR) wird auf Grund der aufgeführten Literatur evident.
Kurz wird über immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bei Masern berichtet und die unumstrittene Spezifität und Beweiskraft dieses Tests unterstrichen.
Erwähnt werden in diesem Zusammenhang der fluoreszenzserologische Nachweis von Masern-Virus-Antigen im Liquor von Patienten, die an subakuter sklerosierender Panenzephalitis (SSPE) erkrankt waren.
Gestreift wird die Anwendung des direkten und indirekten Immunfluoreszenztests bei der Diagnose von respiratory syncytial (R.S.-), Influenza- und Parainfluenza-Virusinfektionen. Grenzen und Fehlerquellen dieser Testverfahren werden angedeutet.
Im parasitologischen Teil der Arbeit wird die Anwendung des Immunfluoreszenztests in der Diagnostik von Toxoplasma gondii und Pneumocystis carinii besonders ausführlich behandelt. Es wird über vergleichende serologische Untersuchungen auf Toxoplasma-Antikörper mittels Sabin-Feldmann-Test (SFT) und Immunfluoreszenzverfahren berichtet, wobei als Résumée gilt, daß der SFT sich weitgehend durch den indirekten Immunfluoreszenztest ersetzen läßt. Der Deutung der serologischen und immunfluoreszenzserologischen Befunde bei Toxoplasmenverdacht wird breiten Raum eingeräumt. Praktische Aspekte der Fluoreszenzmethode werden skizziert und insbesondere wird auf Möglichkeiten ihrer Standardisierung hingewiesen. Erwähnt werden dabei u. a. industriell hergestellte Reagenzien-Kombinationen (sep. Kits oder Sets), die den Antikörpernachweis zeitsparend bei optimaler Arbeitsweise ermöglichen. Im Kapitel über die Wirtschatlichkeit der Immunfluoreszenzmethode werden die Vorteile, die diese Kits für den Routinebetrieb in der Fluoreszenztechnik bieten, ausführlich besprochen.

Im parasitologischen Teil werden ferner die Methoden der modernen Syphilis-Grunddiagnostik aufgezeigt und ausführlich über Möglichkeiten und Grenzen treponemenspezifischer IgM-Diagnostik mittels des IgM-Fluoreszenz-Treponema-Antikkörper-Absorptions- (FTS-ABS-) Tests berichtet.
Auf die untergeordnete Bedeutung der Immunfluoreszenztechnik in der Serologie der Mykosen wird hingewiesen und die Begründung dafür mit Beispielen aufgeführt.
Im Teil „Immunpathologie" wird ein detailliertor Überblick über mannigfache Anwendungen der Immunfluoreszenz gegeben, sie umfassen: Differenzierung der antinukleären Antikörper, die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen, die Lokalisation von Immunkomplexen im Gewebe, die Analyse von Zelloberflächenantigenen und die Verfolgung metabolischer Vorgänge der Kollagensynthese.
Besondere Bedeutung kommt auch in diesem Rahmen den Autoimmunerkrankungen zu, die in der klinischen Kinderheilkunde in weitem Verständnis von Interesse sind und für die die Immunfluoreszenz zu unentbehrlichen Nachweismethode geworden ist.
Im einzelnen wird ausführlich über das Immunfluoreszenz-Bindungsmuster der antinukleären Antikörper berichtet und die Interpretation dieser „ Differnzierungsmuster" erörtert.
Auf eine mögliche immunfluoreszenzoptische Methode zum selektiven Anti-DNS-Nachweis (Immunzytologie an isolierten Hühnererythrozyten) wird näher eingegangen und die Methodik diskutiert. Auch in diesem Zusammenhang wird auf industriell hergestellte, mit Antigenen beschichtete Objektträger und Reagenzien-Kombinationen (Kits) hingewiesen, die nach dem Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz aufgebaut - den fluoreszenzoptischen Nachweis von antinukleären Faktoren erleichtern und wesentlich zur Standardisierung dieser Testmethode beitragen.
Ein ausführliches Kapitel befaßt sich mit der immunhistologischen Diagnostik von Immunkomplexniederschlägen in der

Niere. Nach immunologischen Kriterien werden Sonderformen von Antibasalmembrannephritis und Immunkomplexnephritis vorgestellt, unter anderem: Poststreptokokkennephritis, IgA/IgG-Nephropathie, Glomerulonephritis bei persistierendem Hepatitis- B-Antigen, membranöse Glomerulonephritis, Herdförmige Glomeruläre Sklerosen, membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN), Renoplulmonales Syndrom (Goodpasture-Syndrom), interstitielle Nephritis, Lupusnephritis, Penicillamin-Nephropathie, Transplantatnephritis.
In einer kritischen Schlußbetrachtung werden Problematik und Aussagewert der Immunnephrologie erörtert, wie zum Beispiel Diskrepanzen von Histologie und Immunhistologie.
Zusammenfaßend und ausführlich wird im folgenden der diagnostische Wert der Immunfluoreszenzmethode bei der Diagnostik bestimmter Kollagenkrankheiten aufgezeichnet. Die juvenile chronische Polyarthritis und Lupus erythematodes, die wohl klinische wichtigsten „Kollagenosen" im kindlich-jugendlichen Alter, werden im besonderen Maße berücksichtigt.
Ausführlich werden Ätilologie, Hypothesen zur Pathogenese und spezifische Immunfluoreszenzuntersuchungen des Hämolytisch-urämischen Syndroms dargelegt und letztere Untersuchungsmethoden in ihrer Wertigkeit differenziert.
Die Anwendungsmöglichkeiten der Immunfluoreszenz bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen werden in einem eigenen Kapitel erörtert, wobei die Differenzierung in Hepatitis-B-Virus induzierte chronische Hepatitiden und autoimmune chronische Hepatitiden vorgenommen wird. Ein besonderer Hinweis gilt in diesem Zusammenhang dem Problem der Spätfolgen nach Tumortherapie im Kindesalter: Hepatitis-B-Oberflächen-(surface)-Antigen-Persistenz und Lebererkrankungen. Weniger ausführlich wird die diagnostische Bedeutung immunhistologischer Untersuchungen bei Alpha-1-Antitrypsinmangel beschrieben.
Näher wird auf die immunfluoreszenzoptische Nachweismöglichkeit von immunologischen Membranmarken (Zellmarkern) in der Leukämiediagnostik eingegangen. Auf die praktische Bedeutung dieser Immundiagnostik (Zellmembranuntersuchungen) wird hin-

gewiesen: u. a. ungewöhnliche Heterogenität der Akuten Lymphatischen Leukämie, Frühdiagnostik des hämatologischen Rezidivs.
Der Einsatz immunserologischer Untersuchungen im Rahmen der Diagnostik von Kollagenkrankheiten ist Thema des vorletzten Kapitels des immunpathologischen Teils der Arbeit. Die immunfluoreszenzserologische Identifizierung des Kollagenpolymorhpismus werden beschrieben mit umfaßender Darstellung der immunfluoreszenzoptischen Diagnostik von Osteogenesis imperfecta tarda.
Im folgenden wird noch ein einfacher Screening-Fluoreszenz-Test aufgeführt zum Nachweis einer Galaktose-Metabolismus-Störung der Galaktosämie. Der Vergleich mit anderen Tests wird diskutiert und praktische Bedeutung der Früherkennung im Hinblick auf Behandlungsmöglichkeiten betont.
Das Kapitel „Wirtschaftlichkeit der Immunfluoreszenztechnik" faßt die Anwendungsmöglichkeiten dieses Nachweisverfahrens zusammen, um den Einsatz in einer pädiatrischen Poliklinik kalkulierbar zu machen.
Die Preisrentabilität wird anhand von Kostenberechnungen industriell hergestellter Reagenzien-Kombinationen demonstriert.

Autorenverzeichnis

1. AL-AUBAIDI, J.M. und FABRICANT, J.
The Practical Application of Immunofluorescence (Agar Block Technic) for the Identification of Mycoplasma.
Cornell Vet. 61:519-542(1971)

2. ALBINI, B. und WICK, G.
Hühnererythrozytenkerne als Dauerpräparation für den Nachweis antinukleärer Faktoren im indirekten Immunfluoreszenztest.
Wien. klin. Wschr. 84:416-417(1972)

3. ALEXANDER, H.E.
The Hemophilus Group, in: Dubos, R.J., Hirsch, J.G. (eds.) Bacterial and Mycotic Infections of Man
ed. 4. Philadelphia JB Lippincott Co., 724-741(1965)

4. ALTMAN, A.J., PALMER, C.G. und BACHNER, R.L.
Juvenile Chronic Granulocytic Leukemia: A Panmyelopathy with Prominent Monocytic Involvement and Circulating Monocyte Colong-Forming Cells
Blood, 43:341(1974)

5. ANDERS, D.
Membranoproliferative Glomerulonephritis
Dtsch. med.Wschr. 102:1295-1296(1977)

6. ANDERSON, C.H. und MICHAELS, R.H.
Cytomegalovirus Infection : Detection by Direct Fluorescent-Antibody Technique
Lancet, 12:308-309(1972)

7. ANDERSON, J.H., WEISS, L., REBUCK, J.W., CABAL, L.A. und SWEET, L.C.
Hyperreactivity to Cow's Milk in an Infant with LE and Tart Cell Phenomenon
J. Pediatr., 84:59-67(1974)

8. ANTONIADIS, G.
Immunologischer Nachweis intrauteriner Infektionen
diagnostik 5:590-591(1972)

9. ARNOLD, W., HOPF, U. und MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.-H.
Immunologische Diagnostik chronischer Lebererkrankungen
Dtsch. med. Wschr. 103:403-405 (1978)

10. ASAMER, H.
Die Immunhistologie und ihre klinische Anwendung
Wiener Zeitschrift für Innere Medizin und ihre Grenzgebiete, 49:81-94 (1968)

11. ASAMER, H., WEISER, G., STÜHLINGER, W. und DITTRICH, P.
Klinik und Immunologie des Goodpasture-Syndroms
Dtsch. med. Wschr. 100:513-518 (1975)

12. ASPÖCK, H.
Diagnostik pränataler Infektionen II: Toxoplasmose
Laboratoriumsblätter. Für die Medizinische Diagnostik, Behring-Werke AG, Marburg/Lahn, 26:12-15 (1976)

13. ATKINS, C.J., KONDON, J.J., QUISMORIO, F.P. und Friou, G.J.
Chorcid Plexus in Systemic Lupus Erythematodes
Ann. int. Med. 76:65-72 (1972)

14. ATWOOD, W.G. und MILLER, J.L.
Fluorescent Treponemal Antibodies in Fractionated Syphilitic Sera.
The Immunoglobulin Class.
Arch. Dermatol. 100:763-769 (1969)

15. BALAKRISHNAN, S.L., ARMSTRONG, D., RUBIN, A.L. und STENZEL, K.H.
Cytomegalovirus Infection after Renal Transplantation. Report of a Case with Viremia and Atypical Lymphocytosis.
JAMA 207:1712-1714(1969)

16. BALDWIN, D.S., GLUCH, M.C., SCHACHT, R.G. und GALLO, G.
The Long-Term Course of Poststreptococcal Glomerulonephritis
Ann. int. Med. 80:342-358 (1974)

17. BALDWIN, R.W.
Immunological Aspects of Chemical Carcinogenesis.
Advanc. Cancer Res. 18:1-75(1973)

18. BALC, G.
Zur prognostischen Bedeutung des Zeitpunktes einer pränatalen Infektion mit dem Varizella-Zoster-Virus
Mschr. Kinderheilk. 125:655-659(1977)

19. BARILE, M.F. und DEL GIUDICE, R.A.
Isolations of Mycoplasmas and their Rapid Identification by Plate Epi-Immunfluorescence, in: Pathogenic Mycoplasmas, a CIBA Foundation Symposium.
Associated Scientific Publishers, Amsterdam, 165-185(1972)

20. BARTHELMES, H. und SÖNNICHSEN, N.
Die Bedeutung der Immunfluoreszenzverfahren für die Dermatologie (Technik und klinische Anwendung)
Derm. Mschr. 156:184-211(1970)

21. BAUMANN, W., ARNOLD, W. und MEYER zum BÜSCHENFELDE, K.-H.
Membran-fixiertes IgG, HB_s AG - und HB_c AG - Nachweis an isolierten Hepatozyten und Leberkryostatschnitten bei Kindern mit chronisch entzündlichen Lebererkrankungen
Mschr. Kinderheilk. 124:487-488(1976)

22. BAUMANN, W., GUTJAHR, P., ARNOLD, W. und MEYER zum BÜSCHENFELDE, K-H.
Spätfolgen nach Tumortherapie im Kindesalter: HB_sAG-Persistenz und Lebererkrankung
Mschr. Kinderheilk. 125:574-575(1977)

23. BECK, J.S. OAKLEY, C.L. und ROWELL, N.L.
Transplacental Passage of Antinuclear Antibodies
Arch. Dermatol. 93:656-663(1966)

24. BENNETT, J.M., CATOVSKY, D., DANIEL, M.T., FLANDRIN, G., GALTON, D.A.G., GRALNICK, H.R. und SULTAN, C.
Proposals for the Classification of the Acute Leukemias
Brit. J. Haemat. 33:451-548(1976)

25. BERG, P.A.
Autoantikörper bei Leberkrankheiten
Ärztl. Lab. 22:26-29(1976)

26. BERG, P.A.
Chronisch-aktive (aggressive) Hepatitis
Dtsch. med. Wschr. 101:1536-1543(1976)

27. BERG, P.A., BINDER, R., LINDNER, H., BANNASKI, H., MAAS, D., HENNING, H. und BRÜGEL, H.
Heterogenität mitochondrialer Autoantikörper zur serologischen Diagnose der primär-bilären Zirrhose und des Pseudo-Lupus erythematodes mit Hilfe von zwei verschiedenen Antifraktionen
Dtsch. med. Wschr. 100:1123-1127(1975)

28. BERGER, J.
IgA Glomerular Deposits in Renal Disease
Transplant. Proc. 1:939-944(1969)

29. BERCQUISIT, N.R.
The Pulsed Dye Laser as a Light Source for the Fluorescent Antibody Technique
Scand. J. Immunol. 2:37-44(1973)

30. BERTRAMS, P., PFÖRTNER, M., NEUSSEL, H. und LINZENMEIER, G.
Coli-Enteritis des Säuglings. Quantitative und fluoreszenzserologische Verlaufsuntersuchungen
Münch. med. Wschr. 38-42(1970)

31. BETTS, R.F., GEORGE, S.D., RUNDELL, B.B., FREEMAN, R.B. und DOUGLAS, R.G.
Comparative Activity of Immunofluorescent Antibody and Complement-Fixing Antibody in Cytomegalovirus Infection
J. clin. Miorbiol. 4:151-156(1976)

32. BEUTLER, E. und BALUDA, M.C.
A Simple Spot Screening Test for Galactosemia
J. Lab. and Clin. Med. 68:137-141(1966)

33. BEUTLER, E., BALUDA, M.C. und DONNELL,G.N.
A New Method for the Detection of Galactosemia and its Carrier State
J. Lab. and Clin. Med. 64:694-705(1964)

34. BEUTNER, E.H.
Defined Immunofluorescent Staining: Past Progress , a Present Status, and Future Prospects for Defined Conjugates.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 177:506-526(1971)

35. BEUTNER, E.H., SEPULVEDA, M.R. und BARNETT, E.V.
Quantitative Studies of Immunofluorescent Staining
Bull. Wld. Hlth. Org. 39:587-606(1968)

36. BIBERFELD, G.
Distribution of Antibodies within 19S and 7S Immunoglobulins Following Infection with Mycoplasma Pneumoniae.
J. Immun. 100:338-347(1968)

37. BIBERFELD, G.
Antibody Responses in Mycoplasma Pneumoniae Infection in Relation to Serum Immunoglobulins, especially IgM.
Acta path. microbiol. scand. Sect. B, 79:620-634(1971)

38. BIENIAS, L.
Indirekte Immunfluoreszenzreaktion in der Serodiagnostik der Candidosis
Mykosen 14:115-118(1971)

39. BIHARI, M., KALLEN, R.J. und SPANGO, P.H.
The Course of Membranous Nephropathy in Childhood
Fifth International Congress of Nephrology. Mexico City (1972)

40. BINDER, R.A., JENCKS,J.A. GHUN, P. und RATH, C.E.
B-cell Origin of Malignant Cells in a Case of American Burkitt's lymphoma.
Cancer (Philad.) 36:161-168(1975)

41. BÖHME, H.
Erfahrungen mit der indirekten Immunfluoreszenzreaktion bei Candidiasis
Derm. Mschr. 159:359-362(1973)

42. BÖSENBERG, H.
Erfahrungen beim Nachweis von Dyspepsie-Coli-Keimen mit Hilfe von fluoreszierenden Antiseren
Arch. Hyg. 152:453-456(1968)

43. BOHLE, A.
Niere und harnableitende Organe, in: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 617-642(1975)

44. BOHLE, A.
Zur Morphologie, Klinik und Prognose der verschiedenen Glomerulonephritisformen
Klinikarzt, 5:822-836(1976)

45. BOHLE, A., BUCHBORN, E., EDEL, H.H., RENNER, E. und WEHNER, H.
Zur pathologischen Anatomie und Klinik der Glomerulonephritis. I. Die akuten und perakuten Glomerulonephritiden.
Klin. Wschr. 47:733-742(1969)

46. BOHLE, A., EICHENSEHER, N., FISCHBACH, H., KRONENBERG, K.H. und WEHNER, H.
Glomerulonephritis in Children and Adults. Analysis of 2,520 renal biopsies.
Proc. 5th int. Congr. Nephrol., Mexico, 1:44-49(1972)

47. BOHLE, A., GÄRTNER, H.V., FISCHBACH, H., BOCK, K.D., EDEL, H.H., FROTSCHER, U., KLUTHER, R., MÖNNINGHOFF, W. und SCHELER, F.
The Morphological and Clinical Features of Membranoproliferative Glomerulonephritis in Adults.
Virch. Arch. A Path. Anat. 363:213-224(1974c)

48. BOHLE, A. und WEHNER, H.
Zur Differentialdiagnose glomerulärer Nierenerkrankungen
Visum 5/6:119-128(1970)

49. BOLTE, H.-D.
Diagnostische Wertigkeit des indirekten Immunfluoreszenztests zum Nachweis humoraler Antikörper gegen Myokard
Internist, 16:180-184(1975)

50. BOMMER, (Marburg/Lahn), in: „Aussprache", p. 197, bei Goetz, O.:
Fluoreszenzoptische Untersuchungen bei interstitieller plasmacelluärer Pneumonie
Mschr. Kinderheilk. 113:194-199(1965)

51. BORKHARDT, H.-L.
Untersuchungen über die Leistungsfähigkeit des TPIL-Tests im Vergleich zum FTA-ABS- und TPI-Standard-Test
Z. Immunit.-Forsch. 146:292-299(1973)

52. BOUTROS, P., MOURTADA, M. und RONALD, A.R.
Urinary Infection Localization
Amer, J. Obstet. Gynaec. 112:379-381(1972)

53. BRADBURY, J.M., ORIEL, Ch.A. und JORDAN, F.T.W.
Simple Method for Immunofluorescent Identification of Mykoplasma Colonies
J. Clin. Microbiol. 3:449-452(1976)

54. BRANDIS, M., KRAUSE, P.-H., HÜNERMUND, G. und BAHLMANN, J.
Perakute Glomerulonephritis beim Kind. Klinische und bioptische Verlaufsbeobachtung über 3 1/2 Jahre
Mschr. Kinderheilk. 124:85-89(1976)

55. BRAVENY, I. und DISKO, R.
Der Toxoplasma-Immunfluoreszenztest: Standardisierung und Bedeutung
Ärztl. Lab. 22:16-20(1976)

56. BREDT, W.
Zur Frage der beim FTA-Test beteiligten Antigen-Komponenten des Treponema pallidum
Z. Hyg. u. Inf., 151:366-374(1965)

57. BREMER, H.J. und LOMBECK, I.
Suchtests zur Erkennung von Stoffwechselanomalien
pädiat. prax. 13:405-421(1973/74)

58. BRODEHL, J. und THOENES, W.
Die renal bedingten Hämaturien
Klinik und Pathomorphologie
Mschr. Kinderheilk. 125:754-758(1977)

59. BROWN, P., BOURNE, J. und STEEL, M.
Immunoperoxidase and Immunofluorescence Techniques in Pig Tissues
Histochemistry, 40:342-248(1974)

60. BROWN, G., CAPELLARO, D. und GREAVES, M.R.
Leukemia Associated Antigens in Man
J. nat. Cancer Inst. 55:1281-1289(1975)

61. BRUNELL, P.A., ROSS, A., MILLER, L.H. und KUO, B.
Prevention of Varicella by Zoster Immune Globulin
N. Engl. J. Med. 280:1191-1194(1969)

62. BURKE, B.A. und GOOD, R.A.
Pneumocystis Carinii Infection
Medicine 52:23-51(1973)

63. BURNS, G.F., NASH, A.A., WARMAN, C.P., BARKER, C.R., Hayhoe, F.G. und CAWLEY, J.C.
A Human Leukemic Cell Expressing Hybrid Membrane Phenotypes
Nature, 268:243-245(1977)

64. BURNS, J.
Background Staining and Sensitivity of the Unlabelled Antibody-Enzyme (PAP) Method. Comparison with the Peroxidase Labelled Antibody Sandwich Method Using Formalin Fixed Paraffin Embedded Material
Histochemistry 43:291-294(1975)

65. CALDWELL, W.J., STULBERG, C.S. und PETERSON, W.D.jr.
Somatic and Flagellar Immunofluorescence of Salmonella
J. Bact. 92:1177-1187(1966)

66. CARTER, Ch.H.
Staining of Coagulase-positive Staphylococci with Fluorescent Antisera
J. Bact. 77:670-671(1959)

67. CATLIN, B.W.
Haemophilus Influenzae in Cultures of Cerebrospinal Fluid
Amer. J. Dis. Child., 120:203-210(1970)

68. CHADWICK, C.S.
Fluorescent Protein Traces: A Simple Alternative to Fluorescein
Lancet I:412-414(1958)

69. CHADWICK, P.
The Relativ Sensitivity of Fluorescent Antibody and Cultura Methods in Detection of Small Numbers of Pathogenic Serotyps of E.Coli
Amer. J. Epidem. 84:150-155(1966)

70. CHADWICK, P. und SLADE, J.H.R.
Identification of Bacteria by Specific Antibody Conjugated with Fluorescein Isothiocyanate
J. Hyg. (Lond.) 58:147-156(1960)

71. CHANDLER, C.A., FOTHERGILL, L.D. und DINGLE, J.H.
The pattern of Dissociation in Hemophilus Influenzae
J. Bact. 37:415-425(1939)

72. CHANOCK, R.M., HAYFLICK, L. und BARILE, M.F.
Growth on Artificial Medium of an Agent Associated with Atypical Pneumonia and its Identification as a PPLO
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48:41-49(1962)

73. CHERRY, W.B., THOMASON, B.M., POMALES-LEBRÓN, A. und EWING, W.H.
Rapid Presumptive Identification of Enteropathogenic Escherichia Coli in Faecal Smears by Means of Fluorescent Antibody
3.Field Evaluation.
Bull. Wld. Hlth. Org. 25:159-171(1961)

74. CHIANG, W.T.,WENTWORTH, B.B. und ALEXANDER, E.R.
The Use of Immunofluorescent Technique for the Determination of Antibody to Cytomegalovirus Strains in Human Sera.
J. Immunol. 104:992-999(1970)

75. CHRISTEN, H. und HENKE, J.
Klinische, klinisch-chemische und pathoanatomische Befunde bei familiärem Alpha-1-Antitrypsinmangel
Mschr. Kinderheilk. 124:384-386(1976)

76. CHUNG, E. und MILLER, E.J.
Collagen Polymorphism: Characterization of Molecules with the Chai Composition $(\alpha 1(III))_3$ in Human Tissues.
Science 183:1200-1201(1974)

77. CLARKE, H.W., FOWLER, R.C. und BROWN, T.McP.
Preparation of Pleuropneumonia-like Organisms for Microscopic Study
J. Bacteriol. 81:500-502(1961)

78. CLINE, M.J., SPRENT, J., WARNER, N.L. und HARRIS, A.W.
Receptors for Immunoglobulin on B-lymphocytes and Cells of a Cultured Plasma Cell Tumor
J. Immunol. 108:1126-1128(1972)

79. COHEN, F., PAGE, R.H. und STULBERG, C.S.
Immunfluorescence in Diagnostic Bacteriology.III. The Identificati of Enteropathogenic E.Coli in Faecal Smears
Amer. J. Dis. Child. 102:112-120(1961)

80. COHEN, J.O. und OEDING, P.
Serological Typing of Staphylococci by Means of Fluorescent Antibodies
J. Bact. 84:735-741(1962)

81. COMBES, B., STASTNY, P., SHOREY, J., EIGENBRODT, E.H., BARRERA, A. HULL, A.R. und CARTER, N.W.
Glomerulonephritis with Deposition of Australia Antigen-Antibody Complexs in Glomerular Basement Membrane
Lancet II:234-237(1971)

82. COONS , A.H.
Labelled Antigens and Antibodies
Ann. Rev. Microbiol. 8:333-352(1954)

83. COONS, A.H., CREECH, H.J. und JONES, R.N.
Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 47:200-202(1941)

84. COONS, A.H., CREECH, H.J., JONES, R.N. und BERLINGER, E.
The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody
J. Immunol., Baltimore 45:159-170(1942)

85. COONS, A.H. und KAPLAN, M.H.
Localization of Antigen in Tissue Cells. II. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody
J. exp. Med. 91:1-13(1950)

86. COOPERATIVE STUDY
Uses for Immunofluorescence Tests of Skin and Sera
Arch. Dermatol. 111:371-381(1975)

87. CREECH, H.J. und JONES, R.N.
The Conjugation of Horse Serum Albumin with 1,2-benzanthryliso-cyanates
J. Amer. Chem. Soc. 62:1970-1975(1940)

88. DAHM, H.
Toxoplasmose-Listeriose, Gefahren für Mutter und Kind
Mat. Med. Nordm. 27:276-285(1975)

89. DANIELSSON, D. und LAURELL, G.
Identification of Enteropathogenic Escherichia Coli O 111:B_4 by Means of Fluorescent Antibody
Acta. Paed. 50:339-345(1961)

90. DAYAN, A.D. und STOKES, M.I .
Immunofluorescent Detection of Measle-Virus Antigens in Cerebrospinal-fluid Cells in Subacute Sclerosing Panencephalitis
Lancet I :891-892(1971)

91. DEACON, W.E., FALKONS, V.H. und HARRIS, Ad.
A Fluorescent Test for Treponemal Antibodies
Proc. Soc. exp. Biolog.96:477-480(1957)

92. DEACON, W.E. und HUNTER, E.F.
Treponemal Antigens as Related to Identification and Syphilis Serology
Proc. Soc. exp. Biolog. 110:352-356(1962)

93. DEACON, W.E., LUCAS, J. B. und PRICE, E.V.
Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption Test (FTA-ABS) for Syphilis
JAMA 198:624-628(1966)

94. DEETJEN, P.
Niere und ableitende Harnwege - Pysiologische Grundlagen in: Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie, Georg Thieme Verlag
Stuttgart, 734-800(1973)

95. DEL GIUDICE, R.A., ROBILLARD, N.F. und CARSKI, R.T.
Immunofluorescence Identification of Mycoplasma on Agar by use of Incident Illumination
J. Bacteriol. 93:1205-1209(1967)

95. DENK, H. und KOVAC, W.
Fluoreszenzmikrophotometrische Untersuchungen über die Beeinflussung der Grippeinfektion der Maus durch Adamantin
Zbl. Bakt. 1 Orig. 202:327-339(1967)

96. DENK, H., RADASKIEWICZ, T. und WITTING, Ch.
Immunofluorescence Studies of Malignant Lymphomas in Formalin-Fixed Material
Z. Krebsforsch. 88:101-102(1976)

97. DE REPENTIGNY, J. und FRAPPIER, A.
Studies on H.pertussis Liquid Cultures. III. Localization of Surface Antigens by Means of Fluorescent Antibody
Canad. J. Mikrobiol. 2:677-683(1956)

98. DESSELBERGER, U.
Bedeutung von Virusinfektionen während der Gravidität für den Feten
Therapiewoche, 46:6876-6899(1975)

99. DIEM, E.
Immunfluoreszenzverfahren und Dermatologie
Z. Hautkr. 48:1732-1760(1973)

100. DONALDSON, P. und WHITAKER, J.A.
Diagnosis of Pertussis by Fluorescent Antibody Staining of Nasopharyngeal Smears
Amer. J. Dis. Child. 99:423-427(1960)

101. DOVER, A.S., ESCOBAR, J.A., DUEÑAS, A.L. und LEAL, E.C.
Penumonia Associated with Measles
JAMA 234:612-614(1975)

102. DRZENIEK, R.
Viral and Bacterial Neuraminidases
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 59:35-74(1972)

103. DYE, W.E. und KUBICA, G.P.
Tuberculosis and other Mycobacterisoses, 160-162(1970) in: Bodily, H.L., Updyke, E.L. und Mason, J.O.:Diagnostic Procedures for Bacteria, Mycotic and Parasitic Infections
5th ed. American Public Health Ass., New York

104. EHRENREICH, Th. und CHURG, J.
Pathology of Membranous Nephropathy
Path. Ann. 3:145-168(1968)

105. EICHLSEDER, W.
Erfahrung n bei der Keuchhustenbehandlung mit Chloramphenicol und Pertussis-Hyperimmun-Globulin
Med. Klin. 57:1749-1751(1962)

106. EICHLSEDER, W.
Überprüfung der Wirksamkeit von Pertussis-Hyperimmun-Globulin und Chloramphenicol auf den Keuchhusten im doppelten Blindversuch
Arch. Kinderheilk. 169:6-31(1963)

107. ELDERING, G., EVELAND, W.C. und KENDRICK, P.L.
Fluorescent Antibody Staining and Agglutination Reactions in Bordetella Pertussis Cultures
J. Bact. 83:745-749(1962)

108. ELSTE, G., KREIL, L. und BITTA, R.
Vergleichende serologische Syphilisdiagnostik mittels klassischer und spezifischer Methoden
Derm. Mschr. 155:535-544(1969)

109. EPSTEIN, E.H. jr.
$(\alpha 1\ (III))_3$ Human Skin Collagen
J. Biol. Chem. 249:3225-3231(1974)

110. ERIKSSON, S.
Pulmonary Emphysema and Alpha-1-Antitrypsin Deficiency
Acta. med. scand. 175:197-205(1964)

111. ESTERLY, J.A. und WARNER, N.E.
Pneumocystis Carinii Pneumonia: Twelve Cases in Patients with Neoplastic Lymphoreticular Disease
Arch. Pathol. 80:433-441(1965)

112. ESTRELA, L.A. und SHUEY, H.E.
Comparison of Fluorescent Antibody, Preciptin, and Bacitracin Disk Methods in the Identification of Group A Streptococci
Amer. Clin. Path. 40:591-597(1963)

113. EWING, W.H. und EDWARDS, P.R.
Isolation and Preliminary Identification of Escherichia Coli Serotypes associated with Cases of Diarrhea of the Newborn
Publ. Hlth. Lab. 12:75-81(1954)

114. FAIRLEY, K.E., BOND, A.G., BROWN, R.B. und HABERSBERGER, P.
Simple Test to Determine the Site of Urinary Tract Infection
Lancet II, 427-428(1967)

115. FAIRLEY,K.F., WHITWORTH, J.A., RADFORD, N.J. und BUTLER, M.
Pregnancy Bacteriuria. The Significance of the site of Infection
Med. J. Aust. 2:424-427(1973)

116. FALKE, D.
Diagnose der Zytomegalie-Virusinfektion, aus: Fragen aus der Praxis
Dtsch. med. Wschr. 102:775(1977)

117. FALSER, N., REISSIGL, H. und SCHWANBERGER, K.
Neuere Methoden zur Labordiagnostik der Toxoplasmose
Zeitschrift für Allgemeinmedizin, 6:289-291(1974)

118. FARBER, S. und WOLBACH, S.B.
Intranuclear and Cytoplasmic Inclusions ("protozoan-like bodies") in the Salivary glands and other Organs of Infants
Amer. J. Path. 8:123-135(1932)

119. FEDERLIN, K.
Pathophysiologie und Laboratoriumsdiagnostik der Kollagenosen
Mschr. Kinderheilk. 124:786-791(1976)

120. FEGELER, K. und FEGELER, F.
Moderne Methoden in der Lues-Serologie (TPI-, FTA(ABS)-, TPHA-Test); Anwendung und Bedeutung
Ärztl. Lab. 22:115-120(1976)

121. FEGELER, K., LUDWIG, G. und NOLTING, S.
Treponema-pallidum-Haemagglutinationstest (TPHA-Test)
Diagnostik 8:114-116(1975)

122. FELLINGER, K., HÖFER, R. und SCHATZ, H.
Die Immunfluoreszenz in der klinischen Routinediagnostik
Wien, klin. Wschr. 80: 57-61(1968)

123. FEORINO, P.M., HUMPHRY, D., HOCHBERG, F. und CHILICOTE, R.
Mononucleosis-Associated Subacute Sclerosing Panencephalitis
Lancet II:530-532(1975)

124. FEY, H.
Erichrone black, a Means for Reduction of Nonspecificity in Immunofluorescence
Path. Microbiol. 38:271-277(1972)

125. FIFE, E.H., BRYAN, B.M., SANDERS, R.W. und MUSCHEL, L.H.
Evalution of the Fluorescent Treponemal Antibodies (FTA) Test for Syphilis. Comparison with Treponema Pallidum Immobilization (TPI) test
Amer. J. clin. Path. 36:105-113(1961)

126. FINE, R.F., GRUSHKIN, C.M., ANAND, S ., LIEBERMANN, E. und WRIGHT, H
Cytomegalovirus in Children
Amer. J. Dis. Child. 120:197-202(1970)

127. FISCHER, K.
Zur immunosuppressiven Therapie in der Behandlung chronischer Erkrankungen
Mschr. Kinderheilk. 118:493-497(1970)

128. FISCHER, K.
Immunhämolytische Anämien
Mschr. Kinderheilk. 124:284-286(1976)

129. FISCHER, K. und POSCHMANN, A.
Autoaggressionskrankheiten
Die gelben Hefte. Immunbiologische Informationen. „E.v.Behring" 4:154-160(1971)

130. FISCHER, K., POSCHMANN, A. und OSTER, H.
Hämolyse bei schwerer Pneumonie infolge Neuraminidasewirkung. Immunfluoreszenzdarstellung der Cryptantigene
Mschr. Kinderheilk. 119:2-8(1971)

131. FORMAN, E.N., PADRE-MENDOZA, T., SMITH, P.S., BARKER, B.E. und FARNES, P.
Ph^1-positive Childhood Leukemias:Spectrum of lymphoid-myeloid Expressions
Blood, 49:549-558(1977)

132. FOX, H.A.,HAGEN, P.A., TURNER, D.J., GLASGOW, L.A. und CONNOR, J.D.
Immunofluorescence in the Diagnosis of Acute Bacterial Meningitis: A Cooperative Evalution of the Technique in a Clinical Laboratory Setting
Pediatrics 43:44-49(1969)

133. FOY, H.M., ALEXANDER, E.R.
Mycoplasma Pneumoniae Infections in Childhood
Adv. Pediat. 16:301-323(1969)

134. FOY, H.M., GRAYSTON, J.T., KENNY, G.E., ALEXANDER, E.R. und McMAHAN, R.
Epidemiology of Mycoplasma Pneumoniae Infection in Families
JAMA 197:859-866(1966)

135. FREEDMAN, P. und MARKOWITZ, A.
A Gamma Globulin and Complement in Disease Kidney
J. Clin. Investigation 41:328-334(1962)

136. FREY, M.L.,THOMAS, C.B. und HALE, P.A.
Recovery and Identification of Mycoplasmas from animals
Ann. N.Y. Acad. Sci. 225:334-346(1973)

137. FRIEDENREICH, V.
Die serologische Auffassung des Thomsenschen Blutkörperchenrezeptors
Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap. 64:455-473(1929)

138. FRIOU, G.J.
Clinical Application of a Test for Lupus Globulin-Nucleohistone Interaction Using Fluorescent Antibody.
Yale J. Biol. Med. 31:40-47(1958)

139. FROMM, G.
Erfahrungen und Ergebnisse mit der T.pallidum-Immunfluoreszenz-Reaktion(FTA-Test)
Zbl. f. Bakt.1 Orig. 198:187-198(1965)

140. FUCHS, G.H.P.
Die Coonsche Fluoreszenz-Antikörper-Technik in der mikrobiologischen Diagnostik und Forschung
Dtsch. Ges. Wesen, 22:1997-2002(1967)

141. FÜLÖP, E., VAJDA, Z. und KÜHN, G.
Zum diagnostischen Wert der Immunfluoreszenzmethode beim Lupus erythematodes
Derm. Mschr. 160:474-482(1974)

142. FULTON, J.D. und VOLLER, A.
Evaluation of Immunfluorescent and Direct Agglutination Methods for Detection fo Specific Toxoplasma Antibodies
Brit. med. J. 7:1173-1175(1964)

143. FULTON, R.E. und MIDDLETON, P.J.
Immunofluorescence in Diagnosis of Measles Infections in Children
J. Pediatr. 86:17-22(1975)

144. FUHR, R.
Vergleichende serologische Untersuchungen auf Toxoplasma-Antikörper mittels Sabin-Feldman-Test und Immunfluoreszenzverfahren
Dtsch. med. Wschr. 99:949-952(1974)

145. FUHR, R.
Über Langzeitkonservierung und Lagerung von gebrauchsfertigen Antigenen auf Objektträgern, dargestellt an Toxoplasma-Antigen
Ärztl. Lab. 22:197-201(1976)

146. GARDNER, P.S., McGUCKIN, R., BEALE, A.J. und FERNANDES, R.
Interferon and Respiratory Syncytical Virus
Lancet I:574-575(1970)

147. GASSER, C., GAUTIER, E., STECK, A., SIEBENMANN, R.E. und OECHSLIN, R.
Hämolytisch-urämische Syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien
Schweiz. med. Wschr. 38:905-909(1955)

148. GAVOSTO, F.A., PILER, C., BACHI, L. und PEGORARO, L.
Proliferation and Maturation Defect in Acute Leukemia
Nature (London) 203:92-95(1964)

149. GEBERT, P.
Über die Aussagekraft fluoreszenzmikroskopischer Stuhluntersuchungen bei der Dyspepsiecoli-Enteritis
Mschr. Kinderheilk. 112:80-84(1964)

150. GEIGER, H., KOHLER, I. und OBLADEN, M.
Die Bestimmung von Gesamtkomplement, Beta-1A/C und Beta-1E bei Früh- und Neugeborenen mit idiopathischem Atemnotsyndrom
Mschr. Kinderheilk. 125:429(1977)

151. GENTH, E.
Die klinische Bedeutung von Antikörpern gegen doppelstrangige DNS
Dtsch. med. Wschr. 103:1025-1027(1978)

152. GERMUTH, F.G. und RODRIGUEZ, E.
Immunpathology of the Renal Glomerulus.
Little, Brown and Co., Boston 1973, zitiert bei: Maintz, J., Henningsen, B., Bucholz, K. und Hardes, H.
"Einteilung humaner Nephritiden nach immunologischen Gesichtspunkten"
ZFA, 52:57-61(1976)

153. GERSHON, A.A. und KRUGMAN, S.
Seroepidemiologic Survey of Varicella: Value of Specific Fluorescent Antibody test
Pediatrics, 56:1005-1008(1975)

154. GERSHON, A.A., RAKER, R., STEINBERG, Sh., TOPF-OLSTEIN, B. und DRUSIN, L.M.
Antibody to Varicella-Zoster-Virus in Parturient Women and their Offspring During the First Year of Life
Pediatrics 58:692-696(1976)

155. GERVAIS, M., RICHARDSON, J.B., CHIU, J. und DRUMMOND, K.N.
Immunofluorescent and Histologic Findings in the Hemolytic Uremic Syndrome
Pediatrics 47:352-359(1971)

156. GILLERT, K.E.
Richtlinien zur Serodiagnostik der Syphilis
Bundesgesundheitsbl. 18:1-7(1975)

157. GODELL, B., JACOBS, J.B., POWELL, R.D. und DE VITA, V.T.
Pneumocystis Carinii: The Spectrum of Diffuse Interstitial Pneumonia in Patients with Neoplastic Disease
Ann. Intern. Med. 72:337-340(1970)

158. GOETZ, O.
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bei interstitieller plasmacellulärer Pneumonie
Mschr. Kinderheilk. 113:194-199(1965)

159. GOETZ, O. und PELLER, P.
Die Diagnostik von Virusinfektionen mit Hilfe der Immunfluoreszenz
Mschr. Kinderheilk. 118:392-393(1970)

160. GOETZ, O. und PELLER, P.
Penumocystis-carinii-Pneumonien
Med. Klin. 69:1774-1778(1974)

161. GOETZ, O., PELLER, P. und LUDE, B.
Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bei Masernerkrankungen
Z. Kinderheilk. 111:51-57(1971)

162. GOLDMAN, M.
Staining Toxoplasma gondii with Fluorescein-labelled Antibody.II. A New Serologic Test for Antibodies to Toxoplasma Based upon Inhibition of Specific Staining.
J. exp. Med. 105:557-573(1957)

163. GOLDMAN, M.
Fluorescent Antibody Methods
New York, Academic. Press/Inc. 1-308 (1968)

164. GREAVES, M.F., JANOSSY, G., ROBERTS, M., RAPSON, N.T., ELLIS, R.B., CHESSELS, J., LISTER T.A. und CATOSKY, D.
Membrane Phenotyping: Diagnosis, Monitoring and Classification of Acute "Lymphoid" Leukemias, in: Thierfelder, S. u. Mitarb.: Immunological Diagnosis of Leukemias and Lymphomas.
Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 61-76(1977)

165. GREGORCZYK, K.
Vorkommen, Nachweis und Bedeutung fluoreszenzoptisch erfaßbarer Treponemenantikörper bei der Syphilis
Ärztl. Labor. 8:221-237, 9:253-275, 10:298-311, 11:329-338(1966)

166. GROßGEBAUER, K., KEGEL, M. und DANN, O.
Neues fluoreszenzoptisches Verfahren in der medizinisch-diagnostischen Mikrobiologie
Dtsch. med. Wschr. 101:1098-1099(1976)

167. GROSSMAN, J., SCHWARTZ, R.H., CALLERAME, M.L. und CONDEMI, J.J.
Systemic Lupus Erythematosus in a 1-Year-Old Child
Am. J. Dis. Child. 129:123-125

168. GROSSMAN, M., SUSSMAN, S., GOTTFRIED, D., QUOCK, C. und TICKNOR, W.
Immunofluorescent Techniques in Bacterial Meningitis
Amer. J. Dis. Child. 107:356-362(1964)

169. HAAS, R., KRAINICK-RIECHERT, Ch.-M. und SCHMITZ, H.
Zytomegalie und Schwangerschaft
Dtsch. med. Wschr. 97:1330-1334(1972)

170. HAMBURGER, J., CROSNIER, J. und DORMANT, J.
Experience with 45 Renal Homotransplantations in Man
Lancet I:985-992(1965)

171. HANSHAW, J.B., STEINFELD, H.J. und WHITE, C.J.
Fluorescent Antibody Test for Cytomegalovirus Antiglobulin
New Engl. J. Med. 279:566-570(1968)

172. HANSON, L.A.
Host-Parasite Relationship in Urinary Tract Infections
J. Infect. Dis. 127:726-730(1973)

173. HANSON, L.A., HOLMGREN, J., JODAL, U. und WINBERG, J.
Precipitating Antibodies to E.Coli O Antigens. A Suggested Difference in the Antibody Response of Infants and Children with First and Recurrent Attacks of Pyelonephritis
Acta paediat. scand. 58:506-512(1969)

174. HASSELMANN, H. und WITTEKIND, D.
Phasenkontrast-Fluoreszenz-Mikroskopie (Ein Verfahren zur simultanen und suczedanen Anwendung des Phasenkontrastverfahrens und der Fluoreszenz-Mikroskopie, insbesondere der Zytologie)
Zs. wiss. Mikr. 63:216-226(1957)

175. HAYHOE, E.G.J.
Leukaemia and Lymphoma: the Prospect of Control.
Schweiz. med. Wschr. 104:1897-1907(1974)

176. HEIDE, K. und SEILER, F.R.
Purification of ALG: Problems with the Isolation of the Relevant Antibodies Only
Behring Inst. Mitt. No. 51:93-95(1972)

177. HEINRICH, S. und BURCKHARDT, F.
Zur Diagnostik von Dyspepsie-Colibakterien mit der indirekten Fluoreszenz-Antikörper-Technik (Sandwich-Verfahren)
Zbl. Bakt. 1. Orig. 216:193-198(1971)

178. HELLWEGE, H.H., BLÄKER, F. und GEBBERS, J.-O.
Hypokomplementämische membranoproliferative Glomerulonephritis bei einem Kind mit Colitis ulcerosa
Mschr. Kinderheilk. 124:706-711(1976)

179. HELMKE, K. und FEDERLIN, K.
Humorale Antikörper und celluläre Immunmechanismen bei verschiede Schilddrüsenerkrankungen sowie ihre Beziehungen zum klinischen Erscheinungsbild
Klin. Wschr. 52:578-588(1974)

180. HELMKE, K. und FEDERLIN, K.
Autoantikörper bei Lupus erythematodes diss. und den sog. Kollagenkrankheiten
Ärztl. Lab. 22:21-25(1976)

181. HELMKE, K., SCHAEBEN, E. und FEDERLIN, K.
Anti-DNS-Antikörper und Nierenbefall bei Patienten mit Lupus erythematodes disseminatus (LED)
Therapiewoche 26:1861-1867(1976)

182. HENI, N., HEISSMEYER, H. undSCHMITZ, H.
Klinik und Diagnostik der Zytomegalie-Hepatitis
Dtsch. med. Wschr. 101:1610-1612(1976)

183. HENNINGSEN, P., MAINTZ, J., BUCHHOLZ, K. und HARDES, H.
Die Penicillamin-Nephropathie
ZFA, 52:77-79(1976)

184. HERZOG, F., GAIFFE, M., GEORGES, R. und JADÉ, Y.
Diagnostik bactériologique de la coqueluche- Diagnostic bactériologique de la coqueluche par la méthode d'aspiration du mucus naso-pharyngien
Immunol. (Paris) 22:235-258(1958)

185. HERZOG, F., MARIE, J. und GAIFFE, M.
Diagnostic bactériologique de la coqueluche par une méthode d'aspiration du mucus naso-pharyngien
Arch. franç. pediat. 11:871-873(1954)

186. HILGARTH, R. und BREMER, H.J.
Angeborene Stoffwechselstörungen - Nahrungsmittel und Diätanweisungen
pädiat. prax. 15:311-347(1975)

187. HÖFER, W. und MISGELD, V.
Renopulmonales Syndrom (Goodpasture-Syndrom)
Med. Klin. 72:972-979(1977)

188. HOFMANN, H.
Diagnostik pränataler Infektionen I: Zytomegalie und Röteln
Laboratoriumsblätter. Für die Medizinische Diagnostik, Behringwerke AG, Marburg/Lahn, 26:9-11(1976)

189. HOLBCROW, E.J.
Standardization in Immunofluorescence
Blackwell Scientific Publications, Oxford & Edinburgh (1970)

190. HOLWERDA, J. und ELDERING, G.
Culture and Fluorescent-Antibody Methods in Diagnosis of Whooping Cough
J. Bact. 86:449-451(1963)

191. HARBERS, E.
Zur Rolle der Histone und der sauren Proteine in den Desoxyribo-proteinen (Nukleohistonen) des Zellkerns
Dtsch. med. Wschr. 90:2074-2078(1965)

192. HUANG, S.N.
Immunohistochemical Demonstration of Hepatitis B Core and Surface Antigens in Paraffin Sections
Lab. Invest. 33:88-95(1975)

193. HULETT, H.R., BONNER, W.A., SWRET, R.G. und HERZENBERG, L.A.
Development and Application of a Rapid Cell Sorter
Clin. Chem. 19:813-816(1973)

194. HUNTER, E.F., DEACON, W.E. und MEYER, P.E.
An Improved FTA-Test for Syphilis, the Absorption Procedure (FTA-ABS)
Publ. Hlth. Rep. 79:410-412(1964)

195. HURD, E.R., LO SPALLUTO, J., BURTONBOY, G., KINSELLA, T.D. und ZIFF, M.
Immune Complexes as Cellular Inclusions in Rheumatoid Arthritis, in: Müller, W., Harwerth, H.G. und Fehr,K: Rheumatoid Arthritis. Pathogenetic Mechanisms and Consequences in Therapeutics (Academic Press: Ney York 1971), 373, - zitiert bei:Rosenthal, M., Graf, U. und Müller, W.: Der Effekt der Therapie auf Immunkomplexe bei der chronischem Polyarthritis
Dtsch. med. Wschr. 102:415-418(1977)

196. HSU, C.C.S., MARTI, G.E., SCHREK, R. und WILLIAMS, R.C.
Lymphocytes Bearing B and T Cell Markers in Patient with Lymphosarcoma Cell Leukemia.
Clin. Immun. Immunopath. 3:385-395(1975)

197. HÜTH, E. und SCHLEIHAUF, T.
Schnelldiagnostik enteropathogener E.coli
Internist. prax. 5:309-312(1965)

198. HIJMANS, W.
Proc. of the Fifth Int. Conference on Immunofluorescence and Related Techniques
Ann. N.Y. Acad. Sci. 254-265(1975)

199. ISSELBACHER, K.J.
Galactosemia, in: Stanbury,J.B., Wyngaarden, J.B. und Fredrickson, D.S., (ed.): Metabolic Basis of Inherited Disease,
New York, McGraw-Hill Book Comp., Inc., 208-225(1960)

200. IVADY, G.
Derzeitige Auffassung über die Entstehungsbedingungen und besten Behandlungsmöglichkeiten der interstitiellen plsamcellulären Pneumonie
Mschr. Kinderheilk. 124:577-581(1976)

201. JÄGER, R., DE ROSSI, A., SCHOLZ, H.G. und WOENCKHAUS, J.W.
Zur Vielfalt der Erscheinungsform von Zytomegalievirusinfektionen
Med. Klin. 70:1646-1650(1975)

202. JEHN, U.
Die Diagnostik der Pneumocystis-carinii-Pneumonie des Erwachsenen
Dtsch. Med. Wschr. 102:486-488(1977)

203. JOHNSON, H.D. und JOHNSON, W.W.
Pneumocystis Carinii Pneumonia in Children with Cancer: Diagnosis and Treatment
JAMA 214:1067-1073(1970)

204. JONES, R.J., SMITH, J.W. und SANDORD, J.P.
Localization if Urinary Tract Infections by Detection of Antibody-Coated Bacteria in Urine Sediment.
New Engl. J. Med. 290:591-593(1974)

205. KABEN, U. und HEISE, H.
Zur Anwendung der Immunfluoreszenztechnik und Agglutinationsreaktion bei der Diagnostik von Hefemykosen
Derm. Mschr. 159:354-359(1973)

206. KABOTH, U., NIEDERHUT, H. und BRUNNER, G.
Serumkomplementfaktoren bei Pseudo-LE-Syndrom
Dtsch. Med. Wschr. 102:470-473(1977)

207. KAPLAN, W. und IVENS, M.S.
Fluorescent Antibody Staining of sporotrichum Schenkii in Cultures and Clinical Materials
J. Invest. Derm. 35:151-159(1960)

208. KAPLAN, M.H. und SUCHY, M.L.
Immunologic Relation of Streptococcal and Tissue Agents. II. Cross-reaction of Antisera to Mammalian Heart Tissue with a Cell Wall Constituent of Certain Strains of Group A Streptococci
J. Exp. Med. 119:643-650(1964)

209. KARITZKY, D. und KÜNZER, W.
Zur Prognose der Hepatopathie bei homozygoten Alpha-1-Antitrypsinmangel
Mschr. Kinderheilk. 125:472-473(1977)

210. KAUFMAN, G.I., NESTER, J.F. und WASSERMAN, D.E.
An Experimental Study of Lasers as Excitation Sources for Automated Fluorescent Antibody Instrumentation
J. Histochem. Cytochem. 19:469-476(1971)

211. KELEN, A.E., AYLLON-LEINDL, LAHZOFFSKY, N.A.
Indirect Fluorescent Antibody Method in Serodiagnosis of Toxoplasmosis
Canad. J. Microbiol. 8:545-554(1962)

212. KENDRICK, P.L., ELDERING, G. und EVELAND, W.C.
Fluorescent Antibody Techniques. Methods for Identification of Bordetella petussis
Amer. J. Dis. Child. 101:149-154(1961)

213. KETTLER, L.H. , DITSCHERLEIN, G. und SCHNEIDER, W.
Zur Systematik der Glomerulonephritis unter besonderer Berücksichtigung des Biopsiematerials
Dtsch. Ges.-Wesen 28:778-783(1973)

214. KIENHOLZ, M.
Die diagnostische Bedeutung der Immunglobuline
Laboratoriumsblätter. Für die Medizinische Diagnostik, Behring-Werke AG, Marburg/Lahn, 3:97-102(1975)

215. KINCAID-SMITH, P. und HOBBS, J.B.
Glomerulonephritis. A Classification on Morphology with Comments on the Significance of Vessel Lesions
Med. J. Aust. 2:1397-1403(1972)

216. KISSLING, R.E. und REESE, D.R.
Anti-rabies Vaccine of Tissue Culture Origin
J. Immunol. 91:362-368(1963)

217. KLEIN, G.
Immunological Surveillance Against Neoplasia
Harvey Lect. 69:71-102(1975)

218. KLEMOLA, E. und KAARIAINEN, L.
Cytomegalovirus as a Possible Cause of a Disease Resembling Infectious Mononucleosis
Brit. Med. J 2:1099-1102(1965)

219. KLIETMANN, W.
Viren als Krebserreger
Mechanismen und Theorien der Tumorgenese aus virologischer Sicht
Dtsch. med. Wschr. 101:117-123(1976)

220. KLIMT, F.
Das Keuchustenbild. Eine Studie an 319 stationär behandelten Patienten
Z. Kinderheilk. 85:423-439(1961)

221. KLIPPEL, J.H., GRIMLEY, P.M. und DECKER, J.L.
Lymphocyte Inclusions in Newborns of Mothers with Systemic Lupus Erythematosus
N. Engl. J. Med. 290:96-97(1974)

222. KNAPP, W.
Charakterisierung der Lymphozyten-Subpopulationen des Menschen
Dtsch. med. Wschr. 102:802-806(1977)

223. KNAPP, W.
Defekte der Lymphozyten-Subpopulationen bei verschiedenen Erkrankungen
Dtsch. med. Wschr. 102:838-842(1977)

224. KNOX, M.J., SHORT, D.H. und WENDE, R.D.
The FTA-ABS-Test for Syphilis. Performance in 1033 Patients
Brit. J. vener. Dis. 42:16-20(1966)

225. KÖDITZ, H. und WAGNER, M.
Die bakteriologische Keuchhustendiagnose mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern
Mschr. Kinderheilk. 113:632-637(1964)

226. KÖDITZ, H. und WEINERT, A.
Zur Schnelldiagnose pathogener Colikeime mittels fluoreszierender Antikörper
Kinderärztl. Prax. 28:513-520(1960)

227. KOHOUT, E., POST, C., AZADEH, B., DUTZ, W., BANDARIZADEH, B. und KAVIDAR, D.
Immunglobulin Levels in Infantile Pneumocystosis
J. Clin. Path. 25:135-140(1972)

228. KÖLLE, G.
Juvenile rheumatoide Arthritis und verwandte Kollagenkrankheiten
Mschr. Kinderheilk. 124:779-785(1976)

229. KRÄUBIG, H.
Toxoplasmose und Schwangerschaft
Med. Klin. 71:603-608(1976)

230. KRAFT, D., MORGENSTERN, H., RAFF, H. und SÖLTZ-SZÖTS, J.
Der Hämagglutinationstest in der Lues-Serologie im Vergleich zu den spezifischen Testen TPI und FTA-ABS.
Z. Haut-. u. Geschl.-Kr. 48:221-226(1973)

231. KRECH, U. und JUNG, M.
Zytomegalie
Pädiat. Fortbild. K. Praxis, 29:62-72(1971)

232. KRECH, U. und JUNG, M.
Epidemiologie, Virologie und virol. Diagnose der Cytomegalie
Klin. Wschr. 51:529-532(1973)

233. KRECH, U., JUNG, M. und SINGEISEN, Ch.
Virologische und klinische Untersuchungen bei konnatalen und postnatalen Cytomegalien
Schweiz. med. Wschr. 98:1459-1469(1968)

234. KRECH, U., JUNG, M. und SONNABEND, W.
A Study of Complement Fixing, Immunofluorescent, and Neutralizing Antibodies in Human Cytomegalovirus Infections.
Z. Immunitaetsforsch. Allerg, Klin. Immunol. 141:411-429 (1971)

235. KREEL, J., ZARPFF,LI., CANTER, J.W., KRASNA, I. und BARONOFSKY, I.D.
Syndrome Following Total Body Perfusion
Surg. Gynec. Obstet. 111:317-321(1960)

236. KRETH, H.W.
Immunologische Untersuchungen bei SSPE
Mschr. Kinderheilk. 124:413-414(1976)

237. KRZYMANSKI, M., MÖLLER, E. und BERGSTRÖM, J.
Cell-Mediated and Humoral Immunity to Streptococcal Wall Antigenic Extract in Patients with Glomerulonephritis and in Healthy Controls
Scand. J. Immun. 4:295-302(1975)

238. KUČERA, K. und KRAMÁŘ,K.
Die „Komplementfärbung" zum Nachweis komplementbindender Antikörper gegen Pneumocystis carinii
Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 209:106-111(1968)

239. KUNZ, Ch., GABLER, F. und HERZOG, F.
Kontrastfluoreszenz, eine neue Methode der Fluoreszenz-Mikroskopie
Mikroskopie 16:1-7(1961)

240. KURNATOWSKI, von, H.-A., SIERRA-CALLEJAS, J.-L., HENKEL, W. und DIEDERICH, K.-W.
Foudroyant tödlich verlaufende Myokarditis durch Streptokokken der Gruppe B
Dtsch. med. Wschr. 102:439-441(1977)

241. LABORATORIUMSBLÄTTER
(Laborblätter für medizinische Diagnostik, Behringwerke AG, Marburg/Lahn)
Die aktuelle Übersicht: Virologische Reagenzien
Laborblätter 25:136(1975)

242. LACEY, B.W.
Cultural Diagnosis of Whooping Cough
(Annex 1)
Bull. Wld. Hlth. Org. 23:31-35(1960)

243. LANZKOWSKY, P. und McCROY, W.
Disseminated Intravaskular Coagulation as a Possible Factor in the Pathogeneses of Thrombotic Microangiopathy (Hemolytic-Uremic-Syndrome)
J. Pediatr. 70:460-462(1967)

244. LAUTROP. H.
Laboratory Diagnosis of Whooping Cough - or Bordetella Infections
Bull. Wld. Hlth. Org. 23:15-35(1960)

245. LAURELL, C.-B.
A Screening Test for Alpha-1-Antitrypsin Deficiency
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29:247-248(1972)

246. LAURELL, C.-B. und ERIKSSON, S.
The Electrophoretic Alpha 1-Globulin Pattern of Serum in Alpha 1-Antitrypsin Deficiency
Scand. J. clin. Lab. Invest. 15:132-140(1963)

247. LEHMKUHL, H.D. und PREY, M.L.
Immunofluorescent Identification of Mycoplasma Colonies Grown on Agar-Covered Glass Slides
Appl. Microbiol. 27:1170-1171(1974)

248. LEVY, St.B., GOLDSMITH, L.A., MOROHASHI, M. und HASHIMOTO, K.
Tubuloreticular Inclusions in Neonatal Lupus Erythematosus
JAMA 235:2743-2744(1976)

249. LEYH, F.
Syphilis-Diagnose heute
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 49:735-744(1974)

250. LIBIT, Sh.A., BURKE, B., MICHAEL, A.F. und VERNIER, R.L.
Extramembranous Glomerulonephritis in Childhood: Relationship to Systemic Lupus Erythematosus
J. Pediatr. 88:394-402(1976)

251. LIEBERMANN, E. und DONNELL, G.N.
Poststreptococcal Glomerulonephritis. A Prospective Study in Children
Pediatrics 43:1005-1017(1969)

252. LIM, S.K., EVELAND, W.C. und PORTER, J.R.
Development amd Evaluation of a Direct Fluorescent Antibody Method for the Diagnosis of Pneumocystis Carinii Infections in Experimental Animals
Appl. Microbiol. 26:666-671(1973)

253. LIM, S.K., EVELAND, W.C. und PORTER, J.K.
Direct Fluorescent-Antibody Method for the Diagnosis of Pneumocysti Carinii Pneumonitis from Sputa or Tracheal Aspirates from Humans
Appl. Microbiol. 27:144-149(1974)

254. LIND, K.
Preparation of Antigen for the Direct Fluorescent Antibody Test in Diagnosis of Mycoplasma Pneumoniae Infection
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. 78:149-152(1970)

255. LUBEC, G.
Zelluläre und humorale Allergie gegen Glomerulumbasalmembranen bei Kindern mit glomerulären Nierenerkrankungen
Mschr. Kinderheilk. 125:842-844(1977)

256. LUDWIG, H. und KNAPP, W.
Immunfluoreszenzdiagnose innerer Erkrankungen
Wien. klin. Wschr. 86:709-716(1974)

257. LUDWIG, H. und SCHERNTHANER, G.
Die Bedeutung immunologischer Mechanismen in der Pathogenese renale Erkrankungen
-Teil2: Immunkomplexnephritiden, zellmediierte Reaktionen, Pyelonephritis, therapeutische Möglichkeiten und Schlußfolgerungen
Med. Klin. 73:691-703(1978)

258. LUGER, A.
Neuere Methoden der Syphilis-Diagnostik
Med. Lab. 25:225-235(1972)

259. LUTHARDT, Th.
Übertragung von Cytomegalievirus (CMV) bei Blutaustauschtransfusionen im Neugeborenenalter
Blut, 6:341-346(1971)

260. LUTHARDT, Th.
Zytomegalie: Gefahr im Kinderkrankenhaus
Selecta, 24:2396(1976)

261. LUTHARDT, Th.
Diagnose der Zytomegalie-Virusinfektion, zum Beitrag von Falke, D. in dieser Wochenschrift 102:775(1977)
Dtsch. med. Wschr. 102:1009-1010(1977)

262. LUTHARDT, Th.
Zytomegalie-, Epstein-Barr- und Varizella-Zoster-Infektionen
Die gelben Hefte, Immunbiologische Informationen, „E.v.Behring" 2:49-54(1977)

263. LUTHARDT, Th. und WEHINGER, H.
Varizella-Zoster-Virus (VZV)-Infektionen. Verlauf, virologische Befunde und Behandlungsversuche bei gesunden und immunkompromittierten Kindern
Mschr. Kinderheilk. 124:411-413(1976)

264. LYNCH, H.J. jr. und PLEXICO, K.L.
A Rapid Method for Screening Sputums for Histoplasma Capsulatum Employing the Fluorescent Antibody Technique
New Engl. J. Med. 266:811-814(1962)

265. MACHERET, H., CRUCHAUD, A., JUNOD, A., CHATELAT, F., GIROMINI, M., WANDERVOGEL, F. und FABRE, J.
Pneumopathie à complexes immuns au cours d'une septicémie à staphylocoque blanc: une complication inhabituelle des valves des Spitz-Holter
Schweiz. med. Wschr. 104:1771-1773(1974)

266. MAINTZ, J., HENNINGSEN, B., BUCHHOLZ, K. und HARDES, H.
Ungewöhnliche Erscheinungsformen des Pseudo-LE-Syndroms
Dtsch. med. Wschr. 100:1558-1563(1975)

267. MAINTZ, J., HENNINGSEN, B., BUCHHOLZ, K. und HARDES, H.
Einteilung humaner Nephritiden nach immunologischen Gesichtspunkten
ZFA, 52:57-61(1976)

268. MAINTZ, J., HENNINGSEN, B., BUCHHOLZ, K. und HARDES, H.
Immunologische Sonderformen humaner Nephritiden
ZFA, 52:62-73(1976)

269. MARMONT, A.M., SANTINI, G., BACIGALUPO, A., DAMASIO, E.E. und GIORDANO, D.

Immunfluorescent Diagnosis of Acute Lymphoblastic Leukaemia

Acta. haemat. 54:129-142(1975)

270. MARSHALL, J.D., EVELAND, W.C. und SMITH, C.W.

Supericrity of Fluorescein Isothiocyanate (Riggs) for Fluorescent-Antibody Technic with a Modification of its Application

Proc. Soc. exper. Biol. (N.Y.) 98:898-900(1958)

271. MARTINI, G.A., STROHMEYER, G. und SODOMANN, C.-P.

Die Panarteriitis nodosa bei chronischer Hepatitis mit Australia-Antigen-Nachweis

Dtsch. med. Wschr. 97:642-645(1972)

272. MARIE, J. und HERZOG, F.

Diagnostic immédiat de la coqueluche par la technique des anti-corps fluorescents. Mise en évidence de Bordetella pertussis dans le mucus nasal. Premiers résultats

Bull. Acad. nat. Méd. (Paris) 146:417-421(1962)

273. MARIE, J., HERZOG, F. und GAIFFE, M.

Le diagnostic rapide de la coqueluche la technique des anticorps fluorescents (100 Premiers résultats)

Sem. Hop. Paris 39:269-272(1963)

274. MANSJOER, H.

Vergleichende serologische Untersuchungen auf Toxoplasmaantikörper unter besonderer Berücksichtigung von Sabin-Feldman-Test und Immunfluoreszenzverfahren.

Med. Diss. Bonn (1971)

275. MARKS, M.J., NAGAHAMA, H. und ELLER, J.J.

Parainfluenza Virus Immunofluorescence. In Vitro and Clinical Application of the Direct Method

Pediatrics, 48:73-78(1971)

276. MARTINEAU, B.

Les anticorps fluorescents dans le diagnostic bactériologique des Escherichia coli entéropathogénes. Comparaison, avec l'isolement deces germes par culture classique

Canad. med. Ass. J. 87:947-953(1962)

277. MATHÉ, G., AMIEL, J.L., POUILLART, T.P., SCHWARZENBERG, G.L. HAYAT, T.M., DE VASSAL, F., BELPOMME, D. und LAFLEUR, M.

Cure Expectancy in Children with Acute Lymphoid Leukemia

Boll. Ist. sieroter. milan. 53:282-292(1974)

278. MATHÉ, G., POUILLART, P., STERESCU, M., AMIEL, J.L., SCHWARZENBERG, M., HAYAT, M., DE VASSAL, F., JASMIN, C. und LAFLEUR, M.

Subdivision of Classical Varieties of Acute Leukemia. Correlation with Prognosis and Cure Expectancy

Eur. J. clin. biol. Res. 16:554-560(1971)

279. MATHÉ, G., POUILLART, P., WEINER, R., HAYAT, M., STERESCO, M. und LAFLEUR, M.

Classification and Subclassification of Acute Leukemias Correlated with Clinical Expression, Therapeutic Sensitivity and Prognosis, in: Mathé, G. und Mitarb. Nomenclature, Methodology and Results of Clinical Trials in Acute Leukemias

Berlin-Heidelberg-New York,Springer, 6-12(1973)

280. MAYERSBACH, H.

Immunhistologische Methoden II. Ein weiterer Markierungsfarbstoff: Dimethyl-1-Naphthylamin-sulfonsäure-5

Acta. histochem, Jena 5:351-368(1958)

281. McALLISTER, R.M., STRAW, R.M., FILBERT,J.E. und GOODHEART, C.R.

Human Cytomegalovirus. Cytochemical Observations of Intracellular Lesion Development Correlated with Viral Synthesis and Release

Virology 19:521-531(1963)

282. McCLUSKEY, R.T., VASALLI, P., GALLO, C. und BALDWIN, D.S.

An Immunofluorescent Study of Pathogenic Mechanisms in Glomerular Diseases

New Engl. J. Med. 274:695-701(1966)

283. McCOFFREY, R., HARRISON, T.A., PARKMAN, R. und BALTIMORE, D.

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Activity in Human Leukemic Cells and in Normal Thymocytes

New Engl. J. Med. 292:775-780(1976)

284. McQUILLIN, J., GARDNER, P.S. und McGUCKIN, R.

Rapid Diagnosis of Influenza by Immunofluorescent Techniques

Lancet III:690-695(1970)

285. MEIGEL, W.N. und MÜLLER, P.K.
Kollagenkrankheiten
Med. Klin. 70:1255-1264(1975)

286. MELLORS, R.C., ARIAS-STELLA, J., SIEGEL, M. und PRESSMANN, D.
Analytical Pathology. II Histopathologic Demonstration of Glomerul-Localizing Antibodies in Experimental Glomerulonephritis
Amer. J. Pathol. 31:687-715(1955)

287. MELLORS, R.C. HEIMER, R., CORCOS, J. und KORNGOLD, L.
Cellular Origin of Rheumatoid Factor
J. exper. Med. 110:875-886(1959)

288. MELLORS, R.C. und ORTEGA, L.G.
Analytical Pathology. III New Observations on Pathogenesis of Glomerulonephritis, Lipid Nephrosis, Periateriitis nodosa, and Secondary Amyloidosis in Man
Am. J. Path. 32:455-499(1956)

289. MERKBLATT Nº 20, DÄV 1973
Toxoplasmose, Erkennung und Verhütung
Deutsches Ärzteblatt, 9:628-632(1973)

290. MEYER-ROHN, J.
Erste Ergebnisse und Erfahrungen mit dem FTA-Test
Hautarzt 15:673-676(1964)

291. MEYER-ROHN, J.
Serologische Verlaufskontrolle der Syphilis
Dtsch. med. Wschr. 98:2030-2031(1973)

292. MEYER-ROHN, J.
Unspezifische positive Reaktionen im FTA-Test
Hautarzt 25:528-529(1974)

293. MEYER, P.E. und HUNTER, F.E.
Antigenic Relationship of 14 Treponemes Demonstrated by Immunofluorescence
J. of Bact. 93:784-789(1967)

294. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H.
Immunpathogenese chronisch entzündlicher Lebererkrankungen
Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 32:31-81(1972)

295. MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H. und ARNOLD, W.
Immunologische Untersuchungsmethoden bei chronisch entzündlichen Lebererkrankungen
Mschr. Kinderheilk. 123:611-616(1975)

296. METZGAR, R.S., MOHANAKUMAR, T., BOLOGNESI, D.P.
Relationships Between Membrane Antigens of Human Leukemic Cells and Oncogenic RNA Virus Structural Components
J. exp. Med. 143:47-62(1976)

297. METZGAR, R.S., MOHANAKUMAR, T., GREEN, R.W., MILLER, D.S. und BOLOGNESI, D.P.
Human Leukemia Antigens: Partial Isolation and Characterization
J. nat. Cancer Inst. 52:1445-1453(1974)

298. MIESCHER, P. und VORLAENDER, K.O.
Immunpathologie in Klinik und Forschung
von Miescher, P. und Vorlaender, K.O., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 501-539(1961)

299. MIHATSCH, M. und ZOLLINGER, H. U.
Ist eine elektronenmikroskopische Untersuchung von Nierenbiopsien klinisch nötig, wünschenswert, unnötig?
Med. Klin. 73:389-394(1978)

300. MITTEILUNGEN AUS DEM BUNDESGESUNDHEITSAMT
Empfehlungen für die Durchführung der Toxoplasma-Seroreaktionen mittels Mikromethode
Bundesgesundhbl. 20:108-112(1977)

301. MÜLLER, F.
Perspektiven immunologischer Syphilis-Diagnostik
Deutsches Ärzteblatt 73:9-14(1976)

302. MÜLLER, F.
Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Sorbent und Treponema-Ultrasonikat auf die Syphilis-Spezifität im FTA-ABS-Test
Ärztl. Lab. 22:351-354(1976)

303. MÜLLER, F.
Methoden moderner Syphilis-Serodiagnostik und Interpretation der Untersuchungsbefunde
Deutsches Ärzteblatt 29:1851-1856(1977)

304. MÜLLER, F. und LOA, P.L.
Neue Möglichkeiten in der immunologischen Diagnostik der Treponem Infektion (Syphilis)
Infection 2:127-131(1974)

305. MÜLLER, H.E.
Die Neuraminidase als pathogenetischer Faktor bei Pneumokokken-Infektionen
Dtsch. med. Wschr. 94:2149-2154(1969)

306. MÜLLER, H.E.
Neuraminidase: Ein Enzym begleitet Infektionserreger
Die gelben Hefte, Immunbiologische Informationen „E.v.Behring" 4:174-177(1976)

307. MÜLLER, P.K., LEMMEN, C., GAY, S. und MEIGEL, W.N.
Disturbance in the Regulation of the Type of Collagen Synthesize in a Form of Osteogenesis Imperfecta.
Eur.J.Biochem. 59:97-104(1975)

308. MÜLLER, P.K., RAISCH, K., MATZEN, K. und GAY, S.
Presence of Type III Collagen in Bone from a Patient with Osteogenesis Imperfecta
Europ. J. Pediat. 125:29-37(1977)

309. MÜLLER, W.
Die immunologische Diagnostik rheumatischer Erkrankungen
Laboratoriumsblätter. Für die Medizinische Diagnostik
Behringwerke Ag, Marburg/Lahn, 3:102-117(1975)

310. MÜLLER, W.
Die Untersuchung der Synovialflüssigkeit
Laboratoriumsblätter. Für die Medizinische Diagnostik Behringwerke AG, Marburg/Lahn 26:25-35(1976)

311. NAGAHAMA, H., ELLER, J.J., FULGINITI, V. und MARKS, M.I.
Direct Immunofluorescent Studies of Infection with Respiratory Syncytial Virus
J. Infect. Dis. 122:260-271(1970)

312. NAGINGTON, J.
Cytomegalovirus Antibody Production in Renal Transplant Patients
J. Hyg. 69:645-660(1971)

313. NAIRN, R.C.
Fluorescent Protein Tracing
ed. 3 Baltimore, Williams + Wilkins Co, 1-503(1969)

314. NAIRN, R.C.
Fluorescent Protein Tracing
ed. 4 Edinburgh, Churchill Livingstone (1976)

315. NAUMANN, G. und WILDFÜHR, G.
Die Bedeutung der Immunofluoreszenz für die Serodiagnose von Infektionskrankheiten
Minch. med. Wschr. 28:1384-1386(1965)

316. NAVAK, N.C. und SACHDEVA, R.
Localization of Hepatitis B Surface Antigen in Conventional Paraffin Sections of the Liver: Comparison of Immunofluorescence, Immunoperoxydase and Orcein Staining Methods with Regard to their Specifity and Reability as Antigen Markers
Am. J. Pathol. 81:479-493(1975)

317. NELSON, J.D., WHITACKER, J.A. und HEMPSTEAD, B.
Diagnosis of Enteropathogenic E.Coli Diarrhea by Fluorescein-labelled Antibodies
J. Pediat. 57:684-688(1960)

318. NICHOLS, R.L. und McCOMB, D.F.
Immunfluorescent Studies with Trachoma and Related Antigens
J. Immunol. 89:545-554(1962)

319. NICOLLE, C. und MANCEAUX, I.
Sur une infection à corps de Leishman (ou organisme voisins) du gondii
C.R.Acad. Sci. (Paris) 147:763-766(1908)

320. NICOLSON, G.L.
Trans-Membrane Control of the Receptors on Normal and Tumor Cells II. Surface Charges Associated with Transformation and Malignancy
Biochim. biophys. Acta 458:1-71(1976)

321. NICOLSON, G.L. und POSTE, G.
The Cancer Cell: Dynamic Aspects and Modifications in Cell Surface Organization (First Two Parts)
New Engl. Med. 295:197-203(1976)

322. NOLTENIUS, H.
Komplement-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren für Immunglobulin G und T-Lymphozyten-Marker in malignen Tumorzellen des Menschen
Med. Klin. 72:1271-1276(1977)

323. NOSKOVÁ, J. und NOVÁK, A.
Fluoreszenz- und zytologische Diagnostik der Masern
Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 216:158-161(1971)

324. NOWACK, H., GAY, S., WICK, G., BECKER, U. und TIMPL, R.
Preparation and Use in Immunohistology of Antibodies Specific for Type I and Type III Collagen and Procollagen
J. Immunol. Methods. 12:117-124(1976)

325. OCKLITZ, H.W. und HAHN, M.
Die bakteriolohische Diagnose der Pertussis, Fluoreszenzserologie und Anzüchtung im Vergleich
1. Mitteilung: Die Anzüchtung von Bordetella Pertussis
Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 194:88-102(1964)

326. OCKLITZ, H.W., HERZMANN, H. und WEPPE, Ch.-M.
Radionuclid und Fluoreszenzfarbstoff in der Markierung von Antikörpern gegen Bordetella pertussis
Mschr. Kinderheilk. 114:383-387(1966)

327. OCKLITZ, H.W., SCHMIDT, E.F., SCHLESINGER, F.L. und MOCHMANN, H.
Routinediagnostik der Enteritiscoli, H-Antigen-Analyse und Immunfluoreszenz
2. Mitteilung: Sanierung und Resistenz
Mschr. Kinderheilk. 118:525-528(1970)

328. OCKLITZ, H.W., SCHMIDT, E.F., SCHLESINGER, F.-L. und MOCHMANN, H.
Routinediagnostik der Enteritiscoli, H-Antigen-Analyse und Immunfluoreszenz
4. Mitteilung: H-Typen und Epidemiologie
Mschr. Kinderheilk. 118:533-537(1970)

329. OCKLITZ, H.W. und WEPPE, Ch.-M.
Die bakteriologische Diagnose der Pertussis, Fluoreszenzserologie und Anzüchtung im Vergleich
2. Mitteilung: Die Antikörperfluorochromierung von Bordetella pertussis
Zbl. f. Bakt. 1. Orig. 194:103-114(1964)

330. OCKLITZ, H.W., WEPPE, Ch.-M. und HAHN, M.
Die bakteriologische Diagnose der Pertussis, Fluoreszenzserologie und Anzüchtung im Vergleich
3. Mitteilung: Ergebnisse des Vergleichs beider Methoden
Zbl. f. Bakt. 1. Orig. 194:212-221(1964)

331. OEHME, J.
Klinik der Cytomegalie
Klin. Wschr. 51:523-528(1973)

332. OMLAND, T.
Serological Studies on Haemophilus Influenzae and Related Species.: IV. Examination of the Type Specific Antigens of H Influenzae by Means of the Gel Precipitation Method
Acta Path.Microbiol.Scand.59:507-520(1963)

333. OSSWALD, P., GATHMANN, H., MÜLLER, G. und KADUK, B.
Alpha 1-Antitrypsinmangel
Klinisches und morphologisches Erscheinungsbild im frühen Kindesalter
Mschr. Kinderheilk. 126:659-666(1978)

334. OSTERWALDER, R., BENINI, A. und JUNG, M.
Zytomegalie-Virusinfektion und Guillain-Barré-Syndrom
Dtsch. Med. Wschr. 98:1812-1813(1973)

335. PAGE, R.H., CALDRONEY, G.L. und STULBERG, C.S.

Immunofluorescence in Diagnostic Bacteriology. I Direct Identification of Hemophilus Influenzae in Smears of Cerebospinal Fluid Sediments

Am. J. Dis. Child. 101:155-159(1961)

336. PAGE, R.H. und STUHLBERG, C.S.

Immunfluorescence in Epidemiologic Control of E.coli Diarrhea. Incidence, Cross-Infections and Control in a Children's Hospital

Am. J. Dis. Child. 104:149-156(1962)

337. PALM, G.

Erfahrungen mit dem Treponemen-Immunfluoreszenz-Absorptions-test (FTA-ABS-Test)

Med. Mschr. 24:58-60(1970)

338. PENTTINNEN, R.P., LICHTENSTEIN, J.R., MARTIN, G.R. und McKUSICK, V.A.

Abnormal Collagen Metabolism in Cultured Cells in Osteogenesis Imperfecta

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72:586-589(1975)

339. PETRAN, E.I.

Comparison of the Fluorescent Antibody and the Bacitracin Disk Methods for the Identification of Group A Streptococci

Amer. J. Clin. Path. 41:224-226(1964)

340. PETZOLD, D.

Der FTA-Test

Med. Welt 15:282-290(1964)

341. PETZOLD, D., und TUPATH-BARNISKE, R.

Zur spezifischen Luesdiagnostik

Dtsch. med. Wschr. 90:950-954(1965)

342. PIEKARSKI, G. und FINGER, H.

Parasitologisch-serologische Diagnostik bei Toxoplasma-Verdacht

Immunität und Infektion 2:160-162(1974)

343. PIEKARSKI, G. und VAN DER ZYPEN, E.
Toxoplasmose - Krankheit der Ungeborenen
Bild der Wissenschaft 4:193-197(1967)

344. PITTMAN, M.
Variation and Type Specifity in the Bacterial Species Hemophilus Influenzae
J. Exp. Med. 53:471-491(1931)

345. PLOEM, J.S.
The Use of a Vertical Illuminator with Interchangeable Dichroic Mirrors for Fluorescence Microscopy with Incident Light
Z. wiss. Mikr. 68:129-142(1967)

346. POETSCHKE, G.
Spezifität und Reproduzierbarkeit der Immunfluoreszenz-Teste
Ärztl. Lab. 22:10-15(1976)

347. POETSCHKE, G. und GREGORCZYK, K.
Moderne serologische Luesdiagnostik
Münch. med. Wschr. 117:999-1004(1975)

348. POETSCHKE, G. und KILLISCH, L.
Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. VI. Fluoreszenz-serologische Untersuchungen an Spirochäten (T. pallidum, Reiterspirochäten), Borrelia recurrens und Schleimhautspirochäten
Schweiz. Z. allg. Path. 22:765-770(1959)

349. POSCHMANN, A. und FISCHER, K.
Hämolytisch-urämisches Syndrom
Überblick und neue pathogenetische Aspekte
Med. Klin. 69:1821-1834(1974)

350. POSCHMANN, A., FISCHER, K., GRUNDMANN, A. und VONGJIRAD
Neuraminidase-induzierte Hämolyse. Experimentelle und klinische Untersuchungen
Mschr. Kinderheilk. 124:15-24(1976)

351. POSTE, G. und WEISS, L.
Some Considerations on Cell Surface Alterations in Malignancy, in: Weiss, L. :Fundamental Aspects of Metastasis
North-Holland Publishing Comp., Amsterdam 25-47(1976)

352. POTTER, E.

Placental Transmission of Viruses with Especial Reference of the Intrauterine Origin of Cytomegalie Inclusion Body Disease

Amer. J. Obstet. Gynec. 74:505-513(1957)

353. PROKOP, O., SCHLESINGER, D. und RACKITZ, A.

Über eine thermostabile "antibody like substance" (Anti-A_{hel}) bei Helix pomatia und deren Kerkunft

Z. Immun.-Forsch. 129:402-412(1965)

354. RAPP, F., RASMUSSEN, L.E. und BENGESH-MELNICK, M.

The Immunfluorescent Focus Technique in Studying the Replication of Cytomegalovirus

J. Immunol. 91:709-719(1963)

355. RAUE, W.

Die Kontrolle der antibiotischen Behandlung von Dy spepsiecoli-infektionen mit der Immunfluoreszenz

Deutsch. Gesundh. 23:985-987(1968)

356. RAUE, W.

Zur ätiologischen Diagnostik akuter Viruserkrankungen

Kinderärztliche Praxis 8:377-382(1971)

357. RAY, M.B. und DESMEL, V.J.

Immunofluorescent Detection of Hepatitis B Antigen in Paraffin Embedded Liver Tissue.

J. Immunol. Methods 6:283-289(1975)

358. REDMAN, J.C.

Pneumocystis carinii in an Adopted Vietnamese Infant - A Case of Diffuse, Fulminant Disease, with Recovery

JAMA, 230:1561-1563(1974)

359. REFAI, M. und ROHDE, R.

Fluoreszenzserologische Diagnostik von enteropathogenen Coli-stämmen

Z. Hyg. 151:331-335(1965)

360. REIMERS, E.

Routineuntersuchungen auf Dyspepsie-Coli mit der Fluoreszenzmethode

Mschr. Kinderheilk. 110:300-304(1962)

361. REMINGTON, J.S.

The Present Status of the IgM Fluorescent Antibody Technique in the Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis

J. Pediatr. 75:1116-1124(1969)

362. REMINGTON, J.S. und DESMONTS, G.

Congenital Toxoplasmosis: Variability in the IgM-Fluorescent Antibody Response and some Pitfalls in Diagnosis

J. Pediatr. 83:27-30(1973)

363. REMY, B., LOMSKY, K. und GILLERT, K.E.

Treponema-pallidum-Haemagglutinationstest - Vergleich mit klassischen Lues-Reaktionen und FTA-ABS-Test

Münch. med. Wschr. 118:39-42(1976)

364. RIECHERS, F.

Interstitielle plasmazelluläre Pneumonie bei Kindern jenseits des ersten Trimenons

Z. Erkr. Atmungsorg. 132:39-47(1970)

365. RIFKIND, D., STARZL, Th.E., MARCHIARO, Th.L., WADELL, W.R. ROWLANDS, D.T. und HILL, R.B.

Transplantation pneumonia

JAMA 189:808-812(1964)

366. RIGGS, J.L., SEIWALD, R.J., BURCKHALTER, J.H., DOWNS, C.M. und METCALF, T.G.

Isothiocyanate Compounds as Fluorescent Labeling Agents for Immune Serum

Amer. J. Path. 34:1081-1097(1958)

367. ROBBINS, J.B., DE VITA, V.T. und DUTZ, W.

Symposium on Pneumocystis carinii Infection

(National Cancer Institute Monograph 43) S.223
zitiert bei Müller, R.W.
Dtsch. Med. Wschr. 102:1170-1171(1976)

368. ROBERTSON, P.W. und KERTESZ, V.
Modified Fluorescent Antibody Technique to Detect Immunglobulin M Antibodies to Toxoplasma gondii in Congenital Infection
J. Clin. Microbiol. 2:461-462(1975)

369. ROIT, I .M.
in: Immunologie, Dr. Steinhoff, D. Verlag
Darmstadt :?29-260(1977)

370. ROLLAND, J.M., NAJRN, R.C. und DAVIES, D.J.
Assay of Antilymphocyte Serum by Membrane Immunofluorescence
J. immunol. Meth. 1:831-836(1972)

371. ROSENDAL, S. und BLACK, F.T.
Direct and Indirect Immunofluorescence of Unfixed and Fixed Mycoplasma Colonies.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 80:615-622(1972)

372. ROSENTHAL, M., GRAF, U. und MÜLLER, W.
Der Effekt der Therapie auf Immunkomplexe bei der chronischen Polyarthritis
Dtsch. med. Wschr. 102:415-418 (1977)

373. ROSER, H.
Neue Aspekte des Antikörpernachweises durch indirekte Immunfluoreszenz auf industriell mit Antigen beschichteten Objektträger
Ärztl. Lab. 22:219-222(1976)

374. ROSER, H.
Empfehlungen für serologische Routineuntersuchungen bei Lues-Verdacht unter Berücksichtigung der modernen luesspezifischen Reaktionen
Ärztl. Lab. 22:249-252(1976)

375. ROTHER, K. und SARRE, H.J.
in: Miescher, P. und Vorlaender, K.O.:
Immunpathologie in: Klinik und Forschung
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2.Aufl. 321-369(1961)

376. SABIN, A.B. und FELDMAN, H.A.
Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (Toxoplasma)
Science 108:660-663(1948)

377. SAINTE-MARIE, G.
A Paraffin Embedding Technique for Studies Employing Immunofluorescence
J. Histochem. cytochem. 10:250-256(1962)

378. SANDERS, D.Y. und GARBEE, H.W.
Failure of Response to Ampicillin in Hemophilus Influenzae Meningitis
Amer. J. Dis. Child. 117:331-333(1969)

379. SANDILANDS, G.P., GRAY, K., COONEY, A., BROWNING, J.D., GRANT, R.M., ANDERSON, J.R., DAGG, J.H. und LUCIE, N.
Lymphocytes with T- and B-Cell Properties in a Lymphoproliferative Disorder
Lancet I:903-904(1974)

380. SCHAUENSTEIN, K., WICK, G., HERZOG, F. und STEINBATZ, A.
Investigation of the Recovery Phenomenon in Immunofluorescence After Laser Exitation
J. Immunol. Meth. 8:9-16(1975)

381. SCHAUER, R.
Biosynthese und enzymatischer Abbau von Acylneuraminsäuren
Instrum.Forsch. 3:21-41(1975)

382. SCHERER, R.
Routineanwendung von Immunfluoreszenzmethoden in der Dermatologie
Deutsches Ärzteblatt 40:2495-2500(1976)

383. SCHERF, H., KÖLLERMANN, M.W. und BUSCH, R.
Nachweis antikörperbeladener Bakterien im Urinsediment bei kindlichen Harnwegsinfektionen
Mschr. Kinderheilk. 126:23-26(1978)

384. SCHERF, H., RUBARTH, O., KÖLLERMANN, M.W. und SCHWARKE, D.
Antikörperbestimmungen im Serum mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenztechnik bei Kindern mit rekurrierenden Harnwegsinfekten
Mschr. Kinderheilk. 125:571-572(1977)

385. SCHIERZ, G. und MEIGEL, W.
Der Treponemen-Immunfluoreszenz-Absorptionstest (FTA-ABS)
Zschr. Haut-Geschl.-Krkh. 43:9-16(1968)

386. SCHMIDT, E.F. und MARKUSE, J.
Experimentelle und klinische Prüfung fluoreszenzmarkierter Antikörper in der Dyspepsiecoli-Diagnostik
Mschr. Kinderheilk. 114:527-533(1966)

387. SCHMIDT, E.F., OCKLITZ, H.W., SCHLESINGER, F.-L. und MOCHMANN, H.
Routinediagnostik der Enteritiscoli, H-Antigen-Analyse und Immunfluoreszenz
1. Mitteilung: Immunfluoreszenz und Anzüchtung
Mschr. Kinderheilk. 118:517-524(1970)

388. SCHMIDT, H., BUDDE, E., NAUMANN, G., NIMMICH, W., GÄRTNER, L., SCHMICKER, R.,KLINKMANN, H. und TOEWE, J.
Die indirekte Immunfluoreszenz in der Serodiagnostik der chronischen Pyelonephritis, Vergleich mit der indirekten Haemagglutination und der Widal-Reaktion
Dtsch. Med. Wschr. 100:2086-2091(1975)

389. SCHMIDT, J.
Untersuchungen über den fluoreszenzserologischen Nachweis des Staphylococcus aureus
Zbl. f. Bakt.1Orig. 195:191-201(1964)

390. SCHMITZ, H. und HAAS, R.
Erfahrungen mit der fluoreszenzserologischen Bestimmung von Antikörpern gegen Cytomegalie-Virus
Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 155:283-296(1970)

391. SCHWEINSBERG, H.
Fluoreszenz-Treponemen-Antikörper-Test
Laboratoriumsblätter für die medizinische Laboratoriumsdiagnostik Behringwerke AG, Marburg/Lahn 5:47-54(1971)

392. SCHWEITZER, J.L., DUNN, A.E.G., PETERS, R.L. und SPEARS, R.L.
Viral Hepatitis B in Neonates and Infants
Amer. J. med. 55:762-771(1973)

393. SCHWENK, H.U. und SCHNEIDER, U.
Immundiagnostik der Leukämien im Kindesalter
Mschr. Kinderheilk. 126:105-112(1978)

394. SELL, S.H.W., CHEATHAM, W.J., YOUNG, B. und WELCH, K.
Hemophilus Influenzae in Respiratory Infections. I Typing by IF-Techniques
Amer. J. Dis. Child 105:466-469(1963)

395. SEELIG, H.P. und SEELIG, R.
Membranoproliferative Glomerulonephritis
Immunologische und pathogenetische Aspekte
Dtsch. med. Wschr. 102:939-944(1977)

396. SEN, L. und BORELLA, L.
Clinical Importance of Lymphoblasts with T Markers in Childhood Acute Leukemia
New Engl. J. Med. 292:828-832(1975)

397. SHAUGHNESSY, H.J., LESKO, M., DORIGAN, F., FORSTER, F., MORRISEY, R. und KESSNER, D.M.
An Extensive Community Outbreak of Diarrhea Due to Enteropathogenic Escherichia coli O 111: B4. II. A Comparative Study of Fluorescent Antibody Identification and Standard Bacteriologic Methods
Amer. J. Hyg. 76:44-51 (1962)

398. SHEFFNER, A.L., MEDLER, E.M., JACOBS, L.W. und SARETT, H.P.
The in Vitro Reduction in Viscosity of Human Tracheobronchial Secretions by Acetylcysteine
Amer. Rev. Respl. Dis. 90:721-729(1964)

399. SHER, J.H. und PERTSCHUK, L.P.
Immunoglobulin G Deposits in the Choroid Plexus of a Child with Systemic Lupus Erythematosus
J. Pediatr. 85:385-387(1974)

400. SIEDE, W. und LUZ, K.
Agglutinabilität und Pathogenität des Bact. coli bei Erkrankungen der Harnwege
Klin. Wschr. 20:241-245(1941)

401. SIMONE, J.V., AUR, R.J.A., HUSTER, H.C., VERZOSA, M. und PINKEL, D.
Combined Modality Therapy of Acute Lymphocytic Leukemia
Cancer 35:25-35(1975)

402. SKAUG, K., ENG, J., ÖRSTAVIK, I. und HAUG, K.W.
The Diagnostic Value of Determination of IgM Antibodies Against Mycoplasma Pneumoniae by the Indirect Immunofluorescent Antibody Test
Acta path. microbiol. scand. sect. 84:170-176(1976)

403. SMEETS, F. und GOWER, P.E.
The Site of Infection in 133 Patients with Bacteriuria
Clin. Nephrol. 1:290-296(1973)

404. SMITH, D.H. und Mitarb.
Bacterial Meningitis - a Symposium.
Childrens Hosp. Med. Center, Boston, Pediatrics 52:586-600(1973)
-als Referat für die Praxis, Referentin Baumgartner, H., Wien, Bakterielle Meningitis - Diagnose und Therapie - pädiat. prax. 14:441-444(1974)

405. SMITH, P.B., McCOY, E. und WILSON, J.B.
Identification of Staphylococci in Nonfat Dry Milk by the Fluorescent Antibody Technique
(Bestimmungen von Staphylokokken in Magermilchpulver mit Hilfe der fluoreszierenden Antikörpertechnik)
J. Dairy Sci. 45:729-734(1962)

406. SPRINGER, T.A., KAUFMAN, J.F., TERHORST, C. und STROMINGER, J.L.
Purification and Structural Characterization of Human HLA-Linked B-Cell Antigens
Nature 268:213-217(1977)

407. SPRUNT, K., VAIL, D. und ASNES, R.S.
Identification of Streptococcus Pyogenes in a Pediatric Out-Patient Department: A Practical System Designed for Rapid Results and Resident Teaching
Pediatrics 54:718-723(1974)

408. SCRABSTEIN, J.C., MORRIS, N., LARKE, R.P.B. deSA, D.J., CASTELLINO, B.B. und SUM, E.

Is there a Congenital Varicella Syndrome?

J. Pediatr. 84:239-243(1974)

409. STÄUBLI, M., MIETH, D., BADER, P., LARGIADÉR, F. und BINSWANGER, U.

Konnatale Zytomegalie des Kindes einer nierentransplantierten Mutter

Dtsch. Med. Wschr. 101:414-416(1976)

410. STAGNO, S., REYNOLDS, D., TSIANTOS, A., FUCILLO, D.A., SMITH, R. TILLER, M. und ALFORD, C.A.

Cervical Cytomegalovirus Excretion in Pregnant and Non-Pregnant Women: Suppression in Early Gestation

J. Infect. Dis. 131:522-527(1975)

411. STEINER, H.

Konnatale Zytomegalie

Pädiat. Prax. 14:425-436(1974)

412. STEVENS, T.D. und WATKINS, H.M.S.

Rapid Identification of Viruses by Indirect Immunofluorescence: Standardization and Use of Anti-Serum Pool to Nine Respiratory Viruses

Appl. Microb. 17:384-393(1969)

413. STEWART, S.M.

The Use of Fluorescent-Antibody-Technique for the Identification of Cultures of Mycoplasma.

Immunology 13:513-516(1967)

414. STICKLER, G.B., SHIN, M.H., BURKE, E.C., HOLLEY, K.E., MILLER, R.H. und SEGAR, W.E.

Diffuse Glomerulonephritis Associated with Infected Ventriculoatrial Shunt

New Engl. J. Med. 279:1077-1082(1968)

415. STOLL, H.U.

Zytomegalievirusausscheidung bei gesunden Kindern im ersten Lebensjahr

Schweiz. med. Wschr. 104:468-472(1974)

416. STOPFKUCHEN, H., SCHÖNBERGER, W. und ENDERS, G.
Polyradiculoneuritis mit stark erhöhter Katecholaminausscheidung bei Cytomegalieinfektion
Mschr. Kinderheilk. 124:469-470(1976)

417. STORCH, W.
Immunfluoreszenz in der Inneren Medizin
Zschr. inn. Med. 27:1061-1067(1972)

418. STORCH, W. und EMMRICH, R.
Anwendungsmöglichkeiten der Immunfluoreszenz bei chronisch-aggressiver Hepatitis
Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr. 33:119-123(1973)

419. STRACHILOFF, D. und MOHR, J.
Die Anwendung der Immunfluoreszenztechnik zur Antigenanalyse bei Salmonellen
1. Mitteilung: Sichtbarmachung des Geißelapparats von Salmonellen
Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 195:29-33(1965)

420. STRACHILOFF, D. und MOHR, J.
Die Anwendung der Immunfluoreszenztechnik zur Antigenanalyse bei Salmonellen
2. Mitteilung: Die zweifarbige Darstellung von O- und H-Antigenen bei Salmonellen mittels verschieden markierten Antikörper
Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 207:195-197(1968)

421. STREULI, R. und GROB, P.J.
Die diagnostische Bedeutung des Alpha 1-Antitrypsins
Dtsch. med. Wschr. 102:398-400 (1977)

422. STÜBNER, G.
Mykoplasmennachweis durch Direktfluorochromierung mit Acridinderivaten
Dtsch. med. Wschr. 101:1257-1258(1976)

423. STULBERG, C.S., CALDWELL, W.J. KENNEDY, D.W. und CALDRONEY, G.
Epidemiologic and Diagnostic Application of Immunofluorescence in a Salmonella Outbreak
Am. J. Epidem. 83:518-529(1966)

424. SYLVESTER, B., SCHÖNTNG, Ch. und NEUHAUS, B.

Modifizierter Immunfluoreszenztest zum Nachweis von Toxoplasma-antikörpern

Zbl. Bakt. Hyg. 1. Orig. 230:538-550(1975)

425. SYMMERS, W.S.C.

Generalized Cytomegalic Inclusion-Body Disease Associated with Pneumocystis Pneumonia in Adults: A Report of 3 Cases, with Wegener's Granulomatosis, Thrombotic Purpura, and Hodgkin's Disease as Predisposing Conditions

J. clin. Path. 13:1-21(1960)

426. TAMACKI, N. und ESSNER, E.

Distribution of Acid Phosphatase, Beta-Glucoronidase and N-Acetyl-Glucosaminidase Activities in Lymphocytes of Lymphatic Tissues of Man and Rodents

J. Histochem. Cytochem. 17:238-247(1969)

427. TAYLOR, C.R.

Immunohistological Study of Follicular Lymphoma, Reticulum Cell Sarcom and Hodgkin's Disease.

Eur. J. Cancer 12:61-75(1976)

428. TAYLOR, C.R. und BURNS, J.

The Demonstration of Plasma Cells and other Immunoglobulin-Containing Cells in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues Using Peroxidase-Labelled Antibody.

J. clin. Pathol. 27:14-20(1974)

429. TEITELBAUM, S.L., KRAFT, W.J. und AVIOLI, L.V.

Bone Collagen Aggregation Abnormalities in Osteogenesis Imperfecta

Calcif. Tissue Res. 17:75-79(1974)

430. TER MEULEN, V., KATZ, M., LEONARD, L.L., LENNETTE, E.H. und KOPROWSKI, H.

Ein neuer serologischer Test zur Diagnostik der subakuten sklerosierenden Panencephalitis

Mschr. Kinderheilk. 119:322-324(1971)

431. THOENES, G.H.

Die Immunhistologie der Glomerulonephritis, Mittler zwischen Pathogenese und Morphologie

Klin. Wschr. 51:739-747(1973)

432. THOENES, W.

Pathohistologische Systematik der Glomerulonephritis unter Berücksichtigung klinischer Aspekte

Nieren- und Hochdruckkrankh. 199-208(1973)

433. THOMAS, D., MOSEDALE, B. und ZOLA, H.

The Use of Indirect Fluorescence Antibody Technique in Assessing the Activity of Antilymphocytic Sera and Antilymphocytic Globulin

Clin. exp. Immunol. 8:987-991(1972)

434. THOMASON, B.M., CHERRY, W.B. und EDWARDS, P.R.

Staining Bacterial Smears With Fluorescent Antibody. VI Identification of Salmonellae in Fecal Specimens

J. Bact. 77:478-486(1959)

435. THOMASON, B.M., CHERRY, W.B., DAVIS, B.R. und POMALES-LEBRON, A.

Rapid Presumptive Identification of Enteropathogenic Escherichia Coli in Faecal Smears by Means of Fluorescent Antibody. I. Preparation and Testing of Reagents

Bull. Wld. Hlth. Org. 25:137-152(1961)

436. THOMSEN, O.

Ein vermehrungsfähiges Agens als Veränderer des isoagglutinatorischen Verhaltens der roten Blutkörperchen, eine bisher unbekannte Quelle der Fehlbestimmungen

Z. Immun.- Forsch. 52-85-107(1927)

437. TIESLER, E.

Ergänzende Diagnostik bei Verdacht auf A-Streptokokkenerkrankungen

Deutsches Ärzteblatt 47:3239-3242(1975)

438. TRÜB, C.L.P., BOESE, W. und POSCH, J.

Diagnostik enteropathogener Colitypen mit dem fluoreszierenden Antikörpertest anläßlich eines Hospitalismus

Med. Mschr. 24:347-353(1970)

439. TSUKIMOTO, I., WONG, K.Y. und LAMPKIN, B.

Surface Markers and Prognostic Factors in Acute Lymphoblastic Leukemia

New. Engl. J. Med. 294:245-248(1976)

440. TYMPNER, K.-D.

Die Bedeutung quantitativer Immunglobulin-Bestimmungen (IgM,IgA) für die Diagnostik und Therapie von Infektionen in der Neugeborenen-Periode

Mschr. Kinderheilk. 19:287-290(1971)

441. TYMPNER, K.-D. und NEUHAUS, F.

Der IgM-Latex-Test - Ein einfaches Verfahren zum schnellen Nachweis von Infektionen in der Neugeborenenperiode

Dtsch. Med. Wschr. 97:2003-2006(1972)

442. VOSS, H., HENNEBERG, G., HERMANN, R., FICHL, H. SCHULTE-OVERBERG, S. und WENER, H.

Die Kopplung von Immunseren mit Fluoresceinisothiocyanat

Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 203:249-276(1967)

443. VOZELJ, M. RAJVER, I. und VERENKO, E.

Laser- Induced Excitation of Fluorescein Isothiocyanate in the Immunofluorescence

Experimentia 28:1098-1099(1972)

444. WACHSMUTH, E.D.

Eine einfache und spezifische Fluoreszenzmethode für den Nachweis von Antigenen und Antikörpern
(A Simple Method for Detecting Antigen Specifity of Tissue Bound Antibody)

Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 54:272-276(1970)

445. WAGNER, M.

Die Verwendung von Sephax zur schnellen Reinigung fluoreszenzmarkierter Antikörperlösungen

Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 185:124-128(1962)

446. WAGNER, M. und HEINRICH, H.

Zum fluoreszenz-serologischen Nachweis von Streptokokken der Gruppe A

Zbl. f. Bakt. 1 Orig. 186:292-302(1962)

447. WATKINS, W.B. und EVANS, J.J.
The Use of Formalin Fixation in an Improved Method for Immunofluorescence Histochemical Investigation of Neurophysen in the Hypotalamus
J. Histochem. Cytochem. 22:128-130(1974)

448. WEHNER, H., RENNER, E., EDEL, H.H., BUCHBORN, E. und BOHLE, E.
Zur pathologischen Anatomie und Klinik der Glomerulonephritis. II. Die postakuten und chronischen Glomerulonephritiden
Klin. Wschr. 47:742-752(1969)

449. WEIPPL, G. und PANTHISCHHO, M.
IgM bei perinatalen Infektionen
Med. Welt. 25:329-330(1974)

450. WELBER, G.
Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. 2. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin
Biochem. J. 51:155-167(1952)

451. WELLER, R.
Zur Erzeugung von Pneumocytosen im Tierversuch
Z. Kinderheilk. 76:366-378(1955)

452. WELLER, T.H. und HANSHAW, J.B.
Virological and Clinical Observations on Cytomegalic Inclusion Disease
New Engl. J. Med. 266:1233-1244(1962)

453. WERNER, H.
Toxoplasmose-Untersuchung und Mütterpaß, Empfehlungen der Toxoplasmose-Kommission des Bundes-Gesundheitsamtes
Bundesgesundhbl. 18:170-171(1975)

454. WHITAKER, J., PAGE, R.H., STUHLBERG, C.S. und ZUELZER, W.W.
Rapid Identification of Enteropathogenic Escherichia Coli O 127:B8 by the Fluorescent Antibody Technique
Amer. Dis. Child. 95:1-8(1958)

455. WHITAKER, J.A., DONALDSON, P. und NELSON, J.D.
Diagnosis of Pertussis by Fluorescent-Antibody Method
New Engl. J. Med. 263:850-851(1969)

456. WICK, G.
Immunfluoreszenz - Versuche zur Standardisierung
Wien. klin. Wschr. 84:2-7(1971)

457. WICK, G., BAUDNER, S. und HERZOG, F.
Immunfluoreszenz
Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn (1976)

458. WICK, G. und BEUTNER, E.H.
Quantitative Studies of Immunofluorescent Staining. III. Comparison of Different Antigens in an Indirect Immunofluorescent Staining System for Human IgG Using the Basement Zone Antibodies of Bullous Pemphigoid
Immunology 16:149-156(1969)

459. WICK, G., SCHAUENSTEIN, K.,HERZOG,F. und STEINBATZ, A.
Investigations of the Recovery Phenomenon after Laser Excitation in Immunofluorescence
Ann. N.Y. Acad. Sci. 254:172-174(1975)

460. WIIK, A.E. und MUNTHE, E.
Restrictions Among Heavy and Light Chain Determinants of Granulocyte-Specific Antinuclear Factors
Immunology 23:53-60(1972)

461. WIIK, A.E. und MUNTHE, E.
Complement-Fixing Granulocyte-Specific Antinuclear Factors in Neutropenic Cases of Rheumatoid Arthritis
Immunology 26:1127-1134(1974)

462. WITTING, Ch.
Immunfluoreszenzoptische Untersuchungen zur experimentellen Glomerulonephritis an Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe
Klin. Wschr. 55:561-562(1977)

463. WILLIAMS, V., GERSHON, A.A. und BRUNELL, P.A.
Serologic Response to Varicella-Zoster Membrane Antigens Measured by Indirect Immunofluorescence
J. Infect. Dis. 130:669-672(1974)

464. WONG, TING-WA und WARNER, N.E.
Cytomegalic Inclusion Disease in Adults. Report of 14 Cases with Review of Literature
Arch. Path. 74:403-422(1962)

465. YEAGER, A.S.
Transfusion - Acquired Cytomegalovirus Infection in Newborn Infants
Am. J. Child. 128:478-483(1974)

466. ZABEL, H.
Aussagewert des loose-body-Tests und des Fluoreszenzverfahren bei Rheumakranken
Zeitschrift für Rheumaforschung 28:454-458(1969)

467. ZAJAC, W., LINDA, H. und LINDA, B.
Über die Verwendbarkeit einer Modifikation der Fluoreszenzkomplementbindungsreaktion in der Syphilisdiagnostik
Derm. Mschr. 155:531-534(1969)

468. ZOLLINGER, H.U.
Morphologische Nosologie der Glomerulonephritiden
Beitr. Path. 143:395-406(1971)

469. Zur Vereinheitlichung der Laboratoriumsdiagnostik der Toxoplasmose
Bundesgesundhbl. 10:170-171(1975)

Herrn Priv.-Doz. Dr. Suschke sage ich Dank für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, meiner Frau für die tatkräftige Unterstützung bei der Literatursammlung.

LEBENSLAUF

Am 13. November 1944 wurde ich, Gerhard Kühnen, als Kind der Eheleute Gerhard Kühnen und Magdalene Kühnen, geb. Pyka, in Hau geboren.
Nach dem Besuch der Grundschule und des Gymnasiums schloß ich die Schulzeit im Februar 1966 mit dem Abitur am Friedrich-Spee-Gymnasium in Geldern ab. Nach der Ableistung des Grundwehrdienstes von 18 Monaten begann ich an der Freien Universität Berlin das Studium der Tiermedizin, das ich im März 1973 an der Ludwig Maximiliansuniversität München mit dem dritten Teil des Staatsexamens abschloß. Im März 1973 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.
Als Doppelstudium begann ich ab SS 1971 zusätzlich das Medizinstudium an der Ludwig Maximiliansuniversität München. Nach 10 Semestern legte ich im Dezember 1976 die ärztliche Prüfung ab.
Am 20. 12. 1971 heiratete ich Johanna Kühnen, geb. van Aerssen.
Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich im Krankenhaus Dritter Orden in München, am Schwabinger Krankenhaus in München, in der Poliklinik der Universität München und in den Städt. Krankenanstalten in Krefeld.
Seit 1. 12. 78 arbeite ich als Assistenzarzt auf der Inneren Abteilung der Städt. Krankenanstalten Krefeld, Niederrhein.
Am 5. 4. 1977 wurde unser Sohn geboren, am 11. 7. 1979 unsere Tochter.